

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET EN BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
VICKY LAHAIE COLLINS

EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA SÉSAMINE SUR DES NEURONES EN
CULTURE EN ÉTAT DE STRESS OXYDANT

NOVEMBRE 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Dr Martinoli de m'avoir donné l'opportunité de faire un travail de recherche aussi intéressant sur un sujet d'actualité. En effet, les produits naturels font de plus en plus la manchette. De plus, je trouve que mon sujet de maîtrise, dont la problématique repose sur la maladie de Parkinson, est très captivant alors que nous vivons dans une société dans laquelle la population est vieillissante et qu'il s'agit d'une maladie pour laquelle il n'existe que des traitements symptomatiques.

Je tiens aussi à remercier le Dr Martinoli pour la confiance et la liberté qu'elle m'a accordées lors de mes travaux de recherche. Le Dr Martinoli est très présente pour ses étudiants qu'elle accompagne de ses bons conseils. À mes débuts au laboratoire deux personnes qui m'ont beaucoup appris dans le domaine technique; il s'agit de Geneviève Bureau et Keith Chiasson que je remercie sincèrement. Tout comme pour Mme Fanny Longpré qui m'a aussi aidée lors de mes travaux de recherche. Elle était toujours à l'écoute, prête à apporter son aide. Je tiens également à remercier Julie Bournival, Cindy Tremblay, Marilyn Plouffe et Julie Carange pour le soutien et la belle ambiance de travail.

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques, causant une dysfonction de la voie nigrostriée impliquée dans le contrôle des mouvements. L'étiologie de cette maladie demeure inconnue, mais des études récentes démontrent l'implication du stress oxydant dans la mort des neurones dopaminergiques. D'autre part, la sésamine, un lignan retrouvé dans les graines et l'huile de sésame, attire de plus en plus l'attention pour ses propriétés physiologiques intéressantes telles que son pouvoir antioxydant. Le but de mon projet était de vérifier le pouvoir neuroprotecteur et antioxydant de la sésamine suite à l'induction d'un stress oxydant sur des cellules neuronales PC12 en culture. Ainsi, un stress oxydant a été induit par le traitement des cellules avec une neurotoxine, le MPP+, très utilisée dans les modèles parkinsoniens. Ensuite, par un test colorimétrique et par l'analyse de la production d'espèces réactives de l'oxygène, il a été mis en évidence que ce lignan protège les neurones dopaminergiques en culture contre le stress oxydant, et ce, à de très faibles concentrations. Nos résultats démontrent que la sésamine ne module pas l'expression des protéines des récepteurs α et β -oestrogéniques. De plus, une analyse de l'effet de la sésamine a été effectuée sur les trois principaux marqueurs des neurones dopaminergiques et comme nos résultats le démontrent, la sésamine ne module pas le niveau de dopamine intracellulaire, elle ne modifie pas la quantité de protéines de la tyrosine hydroxylase, une enzyme clé impliquée dans la synthèse de la dopamine, et la sésamine ne module pas, non plus, la protéine du transporteur de la dopamine. Toutefois, une diminution de l'expression de ces deux protéines a été obtenue lors de l'étude de l'ARNm. Dans le but de poursuivre les recherches sur le caractère

antioxydant de la sésamine, son effet sur la modulation d'enzymes antioxydantes a été étudié. La sésamine augmente considérablement l'activité et l'expression de la protéine de la superoxyde dismutase et elle diminue l'augmentation causée par le MPP⁺ et l'expression de la protéine de synthèse de l'oxyde nitrique. Finalement, la sésamine a aussi la capacité de réduire la neuroinflammation en diminuant l'augmentation de l'interleukine-6 causée par le MPP⁺ dans des cellules gliales. Donc, la sésamine est une molécule neuroprotectrice efficace contre le stress oxydant et elle pourrait ainsi prévenir ou diminuer la progression de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

Mots clés : Maladie de Parkinson, neuroprotection, stress oxydant, lignan, sésamine, antioxydant, dopamine, neuroinflammation,

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES	VIII
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 LA MALADIE DE PARKINSON	1
1.1.1 Historique	1
1.1.2 Incidence et Prévalence	2
1.1.3 Épidémiologie	2
1.1.4 Symptômes.....	4
1.1.5 Diagnostique	7
1.1.6 Neurophysiologie	8
1.1.7 Neuropathologie	10
1.2 ÉTIOLOGIE.....	12
1.2.1 La MP héréditaire.....	12
1.2.2 La MP idiopathique	16
1.3 TRAITEMENTS POUR LA MP.....	23
1.3.1 La L-DOPA	23
1.3.2 Les agonistes DAergiques.....	25
1.3.3 Les anticholinergiques	25
1.3.4 Les traitements chirurgicaux	25
1.3.5 Les thérapies préventives	27
1.4 LA SÉSAMINE	28
1.4.1 Métabolisme de la sésamine	28
1.4.2 Effet antvieillissement de la sésamine	29
1.4.3 Caractère anti-cancer de la sésamine	29

1.4.4 La sésamine diminue le cholestérol sanguin	30
1.4.5 La sésamine inhibe l'activation de cellules microgliales	30
1.4.6 La sésamine protège le foie.....	31
1.4.7 Effet anti-hypertensif de la sésamine	31
1.4.8 Caractère antioxydant de la sésamine.....	31
1.5 MES OBJECTIFS DE RECHERCHE	32
CHAPITRE II	34
MATÉRIEL ET MÉTHODES	34
2.1 CULTURE CELLULAIRE ET TRAITEMENT	34
2.2 CYTOTOXICITÉ	36
2.3 ÉVALUATION DU NIVEAU D'ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE.....	38
2.4 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)	39
2.5 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE « WESTERN »	40
2.6 IMMUNOFLUORESCENCE.....	41
2.7 DOSAGE DE LA DA.....	41
2.8 QUANTIFICATION DE L'ACTIVITÉ DE LA SOD.....	43
2.9 ANALYSES STATISTIQUES	44
CHAPITRE III.....	45
ARTICLE	45
3.1 MA CONTRIBUTION AU TRAVAIL DE RECHERCHE	45
3.2 NEUROPROTECTIVE, ANTI-OXIDATIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ROLE OF SESAMIN in dopaminergic cells under MPP ⁺ -induced oxidative stress	45
CHAPITRE IV	82
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE.....	82
4.1 DOSE RÉPONSE DU MPP ⁺ SUR DES NEURONES EN CULTURE	82
4.2 DOSE RÉPONSE DE LA SÉSAMINE	83
4.3 VÉRIFIER LE POTENTIEL OESTROGÉNIQUE DE LA SÉSAMINE.....	83
4.3.1 La sésamine ne module pas le ER- β	84

4.4 ÉVALUER LA CAPACITÉ DE LA SÉSAMINE À MODIFIER LES TROIS PRINCIPAUX MARQUEURS D'IDENTITÉ NEURONALE DAERGIQUE	85
4.4.1 EFFET DE LA SÉSAMINE SUR L'ARNM DE LA TH.....	85
4.4.2 EFFET DE LA SÉSAMINE SUR LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE LA DA ..	86
4.4.3 EFFET DE LA SÉSAMINE SUR L'ARNM DU DAT.....	87
CHAPITRE V.....	88
DISCUSSION	88
5.1 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION	88
5.2 PERSPECTIVES DE RECHERCHE	94
5.3 CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	96

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : Tremblements au repos	4
FIGURE 1.2 : Posture caractéristique d'un parkinsonien causée par la rigidité	5
FIGURE 1.3 : Images de cerveaux en coupes axiales obtenues à l'aide d'un PET SCAN	7
FIGURE 1.4 : Image de la SN dans le mésencéphale	8
FIGURE 1.5 : Représentation de la voie nigrostriée	8
FIGURE 1.6 : Voies directe et indirecte de la motricité dans les ganglions de la base....	9
FIGURE 1.7 : Détection des CL.....	10
FIGURE 1.8 : Diminution de la pigmentation caractéristique de la SN suite à la dégénérescence sélective des neurones DAergiques.....	12
FIGURE 1.9 : Schéma de l'implication génétique dans la mort cellulaire du neurone DAergique.....	16
FIGURE 1.10 : Structure du MPTP et du MPP+.....	17
FIGURE 1.11 : Transformation du MPTP en MPP+ et entrée du MPP+ dans les neurones DAergiques.....	20
FIGURE 1.12 : Conséquence de l'augmentation du métabolisme de la DA chez les parkinsoniens.....	22
FIGURE 1.13 : Anabolisme et catabolisme de la DA chez l'humain	24
FIGURE 1.14 : Stimulation profonde du cerveau	26
FIGURE 1.15 : Structure de la sésamine	28
FIGURE 2.1 : Cellules PC12.....	36
FIGURE 2.2 : Schéma explicatif de la procédure de traitement des cellules	36
FIGURE 2.3 : Réaction colorimétrique du dosage de la LDH	37
FIGURE 2.4 : Oxydation de la DHR en rhodamine 123 par la présence d'espèces réactives de l'oxygène.....	40
FIGURE 2.5 : Schéma explicatif du dosage de la DA.....	42
FIGURE 2.6 : Schéma représentatif de la réaction enzymatique permettant le dosage de l'activité de la SOD.....	44
FIGURE 4.1 : Dose réponse du MPP+ sur des cellules neuronales en culture	82

FIGURE 4.2 : Dose réponse de la sésamine sur des cellules PC12 natives	83
FIGURE 4.3 : Expression de la protéine du ER- β la technique de « western blot »	84
FIGURE 4.4 : Expression de l'ARNm du ER- β	85
FIGURE 4.5 : Modulation de l'ARNm de la TH suite à un traitement avec la sésamine et à l'induction d'un stress oxydant	88
FIGURE 4.7 : Effet de la sésamine sur le niveau d'ARNm du DAT	87
FIGURE 5.1 : Schéma explicatif de la sortie de la DA intravésiculaire suite à un traitement avec le MPP+	95

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AS	Alpha-synucléine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CL	Corps de Lewy
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DAT	Transporteur de la dopamine
DHR	Dihydrorhodamine-123
ER α	Récepteur oestrogénique alpha
ER β	Récepteur oestrogénique bêta
FBS	Sérum bovin foetal
GABA	Gamma-amino butyrique
GSH	Glutathione
GPX	Glutathione peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HS	Sérum de cheval
iNOS	Synthase d'oxyde nitrique
LDH	Lactate déshydrogénase
L-DOPA	Levo-dihydroxy-phénylalanine
LPS	Lipopolysaccharide
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
NGF	Facteur de croissance du nerf
NO	Oxyde nitrique
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PBS	Tampon phosphate

PET SCAN	Tomographie par émission de positrons
SPECT SCAN	Tomographie d'émission mono photonique
RL	Radicaux libres
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (transcriptase inverse)
SN	Substance noire
SOD	Superoxyde dismutase
SPC	Stimulation profonde du cerveau
TH	Tyrosine hydroxylase
TP	Température pièce
TBS	Tampon TRIS (tris(hydroxyméthyl)aminométhane)

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson

1.1.1 Historique

Il y a des écrits qui datent de très longtemps, dans lesquels on retrouve des descriptions qui coïncident avec les symptômes de la maladie de Parkinson (MP). Certains, tels que Léonard de Vinci (1452-1519), ont décrit des symptômes assez justes sur la maladie. Ce dernier a écrit : « Vous verrez ceux qui déplacent leurs parties tremblantes, comme leurs tête ou mains, sans permission de l'âme; l'âme avec toutes ses forces ne peut pas empêcher ces parties de trembler » [1]. C'est James Parkinson (1755-1824), un physicien anglais, qui fut le premier à décrire formellement les symptômes de la maladie qui porte maintenant son nom. En 1817, il a écrit « An Essay on the Shaking Palsy » pour lequel, il fut célèbre. Dans cet ouvrage, Parkinson décrivit les symptômes de la maladie comme un mouvement de tremblements involontaires dans les membres au repos (même si le poids du membre est supporté), une puissance musculaire diminuée, une tendance à plier le tronc vers l'avant et à passer d'un rythme de marche à celui de la course. Toutefois, les sens et l'intellect ne sont pas atteints [2]. Ce n'est que 60 ans plus tard, que Jean-Martin Charcot (1825-1893) nomma cette affection MP et ajouta la rigidité à la liste des symptômes. La découverte, dans les années 1950, des changements biochimiques dans le cerveau causés par la MP est directement reliée aux travaux d'Arvid Carlsson (né en 1923). Il a démontré que la dopamine est un neurotransmetteur et il a développé une méthode pour doser sa concentration dans les tissus du cerveau. Ce chercheur a aussi découvert, par ses expérimentations sur des animaux qu'une drogue, la réserpine, cause une diminution du niveau de dopamine, ce qui engendre des effets similaires aux symptômes de la MP [1].

1.1.2 Incidence et Prévalence

La maladie neurodégénérative la plus fréquente qui affecte le système moteur est la MP. Elle atteint les gens ayant une moyenne d'âge de 55 ans et l'incidence de la maladie augmente considérablement avec l'âge. Elle passe de 20/100 000 vers l'âge de 55 ans à 120/100 000 vers l'âge de 70 ans [3]. Selon la société Parkinson Canada, 100 000 Canadiens sont atteints de cette maladie, c'est-à-dire un canadien sur 300. Au niveau mondial, Santé Canada estime sa prévalence à 3 765 000 personnes atteintes et son incidence à 305 000 personnes par année [4]. Considérant le vieillissement de la population, ce nombre pourrait augmenter au cours des prochaines années.

1.1.3 Épidémiologie

La MP est une maladie à l'échelle mondiale. Des études épidémiologiques nous révèlent toutefois des différences en ce qui a trait au sexe, à la race et à l'environnement.

De façon générale, les hommes sont plus à risque de développer la MP que les femmes [4-6]. Il y a plusieurs hypothèses pour expliquer ce fait, telles qu'une susceptibilité liée au chromosome X ou encore le style de vie des hommes. Mais l'hypothèse qui retient d'avantage mon attention est que l'oestrogène agit comme agent neuroprotecteur [7-9]. L'oestrogène est une hormone féminine reconnue pour ses bienfaits dans la prévention de maladies cardiovasculaire [10] ainsi que des maladies neurologique [11, 12], telles que la MP [13].

Chade et son équipe précisent que les noirs et les asiatiques sont moins à risque que les blancs de développer la MP [4, 6]. Ce sont les asiatiques qui ont le taux d'incidence le plus faible. Dans certains pays, comme l'Éthiopie, l'incidence de la MP est très faible. Dans ce cas précis, la longévité est probablement en cause, le faible taux

de MP peut être expliqué par le fait que les Éthiopiens ne vivent pas assez longtemps pour développer une maladie liée au vieillissement comme la MP[1].

Les différences d'incidences d'un pays à l'autre peuvent être attribuées à différents facteurs, certains sont dits protecteurs car ils peuvent ralentir la progression de la maladie. Les habitudes alimentaires pourraient faire partie de cette catégorie. En effet, depuis quelques années, la littérature tend à démontrer que certaines différences d'incidences pourraient être expliquées par une importante divergence entre les habitudes alimentaires d'un pays à l'autre. Une alimentation riche en nutriments bénéfiques, comme les antioxydants, pourrait expliquer qu'un pays soit moins touché par la MP. Plus d'études épidémiologiques devront être faites afin d'éclaircir ce point [4, 14]. Alors que d'autres facteurs sont dits de risques, car ils contribuent au développement de la maladie, comme l'exposition à certains polluants.

Au niveau mondial, une étude des actes de décès de 22 états entre 1992 et 1998 a été effectuée. Cette étude avait pour but de cibler les décès dont la cause de la mort était liée à une maladie neurodégénérative pour ensuite tenter d'établir un lien entre la profession autrefois exercée et le risque de développer la MP. Cette investigation révèle que tous les emplois avec une spécification agricole ont plus de risque de développer la MP [15]. En particulier, les expositions aux pesticides sont associées à la MP [16]. La vie rurale, être jardinier, l'agriculture et le fait de boire l'eau des puits sont tous des facteurs de risque de développer la MP [6]. Ces données mettent en évidence le fait que les gens, comme les fermiers, qui sont en contact avec des produits neurotoxiques (pesticides, insecticides et herbicides) ont beaucoup plus de risque de développer la MP. En effet, certaines de ces molécules et leurs analogues sont reconnus et sont utilisés en laboratoire (*in vivo* et *in vitro*) pour recréer les symptômes et la neuropathologie de la MP.

1.1.4 Symptômes

Les symptômes liés à la motricité apparaissent normalement de façon progressive et unilatérale. Au début de la maladie, ils ont peu de répercussions sur la qualité de vie des patients. Puis avec l'évolution de la maladie, les symptômes s'intensifient, deviennent bilatéraux, engendrant une perte de mobilité et d'autonomie dans les activités quotidiennes. Les différents symptômes ne s'expriment pas avec la même intensité chez tous les patients et tous les patients ne présentent pas l'intégralité des symptômes [3]. Les trois symptômes principaux de la maladie sont les tremblements au repos, la rigidité et l'akinésie [4, 15, 17].

1.1.4.1 Symptômes moteurs

Le premier symptôme à faire son apparition, dans la plupart des cas, est le **tremblement au repos** (figure 1.1). Il s'agit de tremblements, non contrôlables, qui surviennent généralement au niveau des mains, de la tête et des jambes [17]. Ces tremblements diminuent ou cessent lors d'un mouvement volontaire du membre. Toutefois, environ 20 % des gens atteints par cette maladie ne développeront aucun tremblement, toutes causes confondues [3, 17, 18].

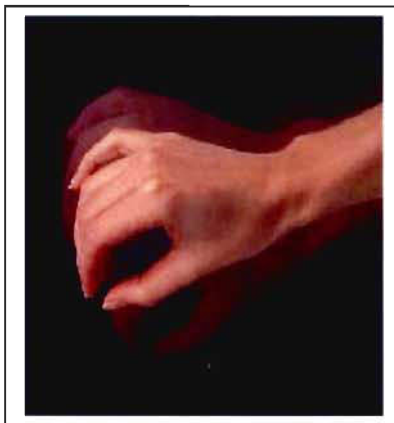


FIGURE 1.1 : Tremblements au repos
(www.brainexplorer.org)

L'absence de mouvements inconscients normaux se nomme **akinésie**. Ainsi, le patient n'a aucune expression faciale, il a la bouche entre ouverte et cligne rarement des yeux. On note aussi une baisse du volume de la voix de même qu'une diminution de la dimension et de la vitesse d'écriture (micrographie). Comme le patient n'a pas le réflexe d'avaler et qu'il doit y penser pour le faire, il n'est pas rare qu'il bave. La démarche d'un patient atteint de la MP est très caractéristique, il avance à petits pas, ses pieds restent collés au sol et ses bras ne balancent pas (immobiles). Un autre symptôme de la MP est la **bradykinésie**, elle consiste en une lenteur à initier les mouvements avec une tendance à l'immobilité en ce qui concerne les mouvements volontaires. Ce symptôme détériore grandement la qualité de vie des patients atteints de la MP. En effet, chaque tâche quotidienne, telle que manger et se vêtir, devient difficile à exécuter et prend beaucoup plus de temps à accomplir [3, 17, 19].

La **rigidité** (ou hypertonie) est l'augmentation du tonus musculaire. Dans une situation normale, les muscles sont relâchés au repos et tendus à l'action. Pour bien exécuter un mouvement, certains muscles doivent se tendre alors que d'autres doivent se relâcher. Pour un parkinsonien, la rigidité peut s'expliquer par une diminution du relâchement musculaire. La posture générale d'un parkinsonien en est affectée et se traduit par des membres semi-fléchis (figure 1.2). Le patient adopte ainsi une posture penchée vers l'avant. La rigidité s'aggrave à mesure que la maladie évolue, ce qui rend les mouvements difficiles [3, 17, 18].



FIGURE 1.2 : Posture caractéristique d'un parkinsonien causée par la rigidité
(www.idiom.com)

Les réflexes de l'équilibre sont aussi perturbés chez les patients parkinsoniens. Pour eux, il est alors difficile de tourner rapidement ou de passer dans un endroit étroit tel qu'un cadre de porte. Ils ont aussi de la difficulté à amorcer le mouvement du pied lorsqu'ils veulent marcher. Il s'agit d'**instabilité posturale**, ce qui les conduit à des pertes d'équilibre et des chutes [20]. C'est pourquoi les parkinsoniens sont souvent confinés à des fauteuils roulants.

1.1.4.2 Symptômes non moteurs

La dépression et l'anxiété sont définies comme des **troubles de l'humeur**. La dépression est fréquente chez les parkinsoniens et certaines études ont démontré que le fait d'avoir des antécédents de dépression était un facteur de risque pour développer la MP [17, 21-23].

Les **troubles cognitifs** font aussi partie des symptômes de la MP [24]. En effet, les patients ont des troubles d'attentions, de mémoires et ils ont aussi, à différents degrés, des dysfonctions exécutives qui peuvent évoluer en démence [1, 25, 26].

Certains patients vont aussi souffrir de **troubles du sommeil**. Ils ont de la somnolence excessive durant la journée et de l'insomnie durant la nuit, accompagnée de troubles au niveau du sommeil REM [3, 20, 27]. Les troubles du sommeil des parkinsoniens peuvent être expliqués par le fait que les neurones dopaminergiques (DAergiques), neurones détruits dans la MP, innervent aussi des régions du cerveau impliquées dans la régulation sommeil-éveil [28].

Les **troubles de perception** peuvent aussi affecter les patients atteints de cette maladie comme la détérioration des contrastes visuels, la discrimination des couleurs, le vertige, la détérioration de la proprioception, la diminution du sens olfactif [1, 17].

Pour terminer, les **troubles d'ordre autonome** peuvent aussi être associés à la MP. Il s'agit de problèmes de peau huileuse ou encore d'incontinence urinaire, de constipation et de perte de poids [17, 18].

1.1.5 Diagnostique

Il n'existe encore aucun test permettant de confirmer formellement la présence de la MP. Le diagnostique de cette maladie est clinique, il repose sur la présence d'une association de deux des trois symptômes cardinaux de la MP, c'est-à-dire les tremblements au repos, la rigidité et la l'akinésie. Il existe plusieurs types de questionnaires symptomatiques utilisés comme outils cliniques qui aident au diagnostique et permettent d'évaluer la sévérité de la maladie. Le questionnaire le plus utilisé est le « *UNIFIED PARKINSON'S DISEASE RATING SCALE* » [1]. Parfois, le diagnostique requiert aussi l'utilisation de scanner [1, 19]. La **tomographie par émission de positrons (PET SCAN)** et la **tomographie d'émission monophotonique (SPECT SCAN)** permettent de mettre en évidence une diminution de l'activité DAergique dans le cerveau (figure 1.3), la dopamine étant le neurotransmetteur à la baisse dans la MP. Le PET SCAN est un outil plus précis, il peut démontrer la diminution de l'activité DAergique dans les ganglions de la base. L'image 1.3 démontre un cerveau, plan axial, obtenu à l'aide d'un [^{18}F]-Fluorodopa PET SCAN qui confirme la déficience en dopamine du cerveau parkinsonien [1].

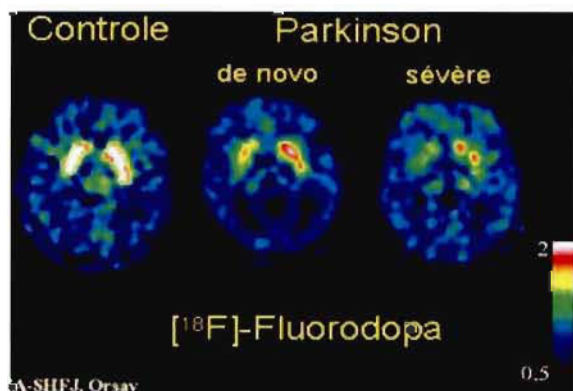


FIGURE 1.3 : Images de cerveaux en coupes axiales obtenues à l'aide d'un PET SCAN
Droite: cerveau normal, Gauche: deux cerveaux parkinsoniens [19]

Le diagnostic final est posé uniquement à l'autopsie s'il y a association d'une diminution neuronale dans la substance noire (SN) et de la présence d'inclusions intracytoplasmiques (voir section 1.1.7.1) [17, 21].

1.1.6 Neurophysiologie

Les cellules nerveuses atteintes par la MP se situent dans la SN « *pars compacta* » du mésencéphale [29]. La couleur noire (voir figure 1.4), caractéristique de cette région du cerveau, est due à la présence de pigments de mélanine qui abondent dans les neurones DAergiques. Ces derniers produisent un neurotransmetteur, la dopamine, impliquée dans le contrôle de la motricité.

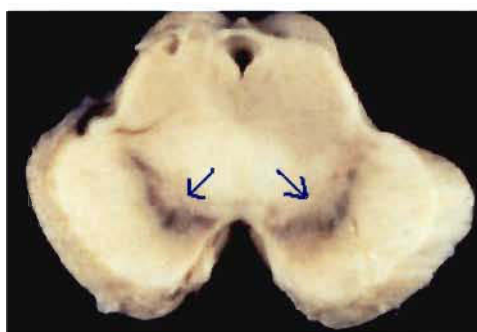


FIGURE 1.4 : Image de la SN dans le mésencéphale
(faculty.washington.edu)

Les neurones DAergiques font partie de la voie nigrostriée (figure 1.5), leur corps cellulaire est situé dans la SN et leur axone projette vers le striatum (noyau caudé et putamen).

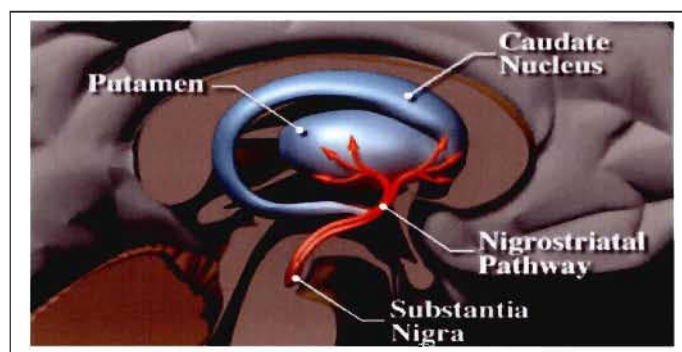


FIGURE 1.5 : Représentation de la voie nigrostriée
(firefighters with Parkinsons.org)

Cette voie DAergique a un impact sur la motricité. En effet, une fois la dopamine libérée, le striatum peut moduler le mouvement de deux façons différentes. Ces deux voies sont représentées dans la figure 1.6. Par le **chemin direct**, la stimulation des neurones du striatum inhibe les neurones du globus pallidus interne. Il en résulte une désinhibition du thalamus responsable de l'excitation du cortex prémoteur qui cause le mouvement. L'effet global du chemin direct est donc une augmentation de la fonction motrice. Tout ce qui inhibe cette voie d'une façon ou d'une autre, conduit à l'akinésie. Dans le **chemin indirect**, la stimulation des neurones du striatum interdit le globus pallidus externe de désinhiber le thalamus. Ainsi, le thalamus ne peut pas activer le cortex moteur. Donc, l'activation de la voie indirecte diminue les fonctions motrices. Au repos, les deux voies (directe et indirecte) sont activées simultanément. Le résultat est qu'il n'y a aucune activation nette du cortex moteur. Le cortex moteur n'est pas plus stimulé qu'inhibé. Dans le cas où le cortex moteur est activé, l'information passe du cortex moteur à la moelle épinière, puis au muscle [30].

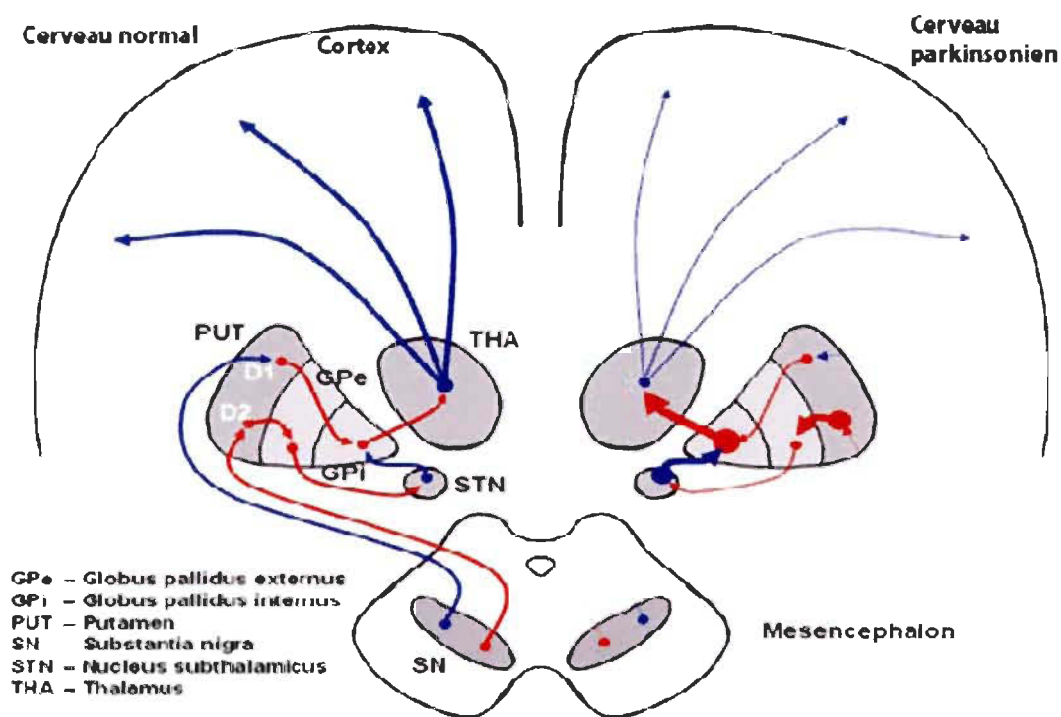


FIGURE 1.6 : Voies directe et indirecte de la motricité dans les ganglions de la base
 La largeur des flèches est proportionnelle à l'intensité
 (Flèches bleues = activatrices, Flèches rouges= inhibitrices)[19]

1.1.7 Neuropathologie

1.1.7.1 Les corps de Lewy (CL)

Les CL sont une caractéristique histologique de la MP. En effet, à l'autopsie pratiquement tous les parkinsoniens présentent des CL alors que seulement 10% des gens qui décèdent d'une maladie, autre que la MP, ont des CL [17]. Ces inclusions sont présentes dans les neurones survivants dans la SN des patients atteints de la MP [17]. Toutefois, les CL ne sont pas exclusifs à la MP, ils sont aussi associés à d'autres maladies telles que la maladie d'Alzheimer [31].

Comme le montre la figure 1.7, les CL sont des inclusions intraneuronales, éosinophiles, de formes sphériques [32]. Ils sont composés d'une accumulation anormale de protéines. Ils contiennent de l'ubiquitine, de l'alpha synucléine et des neurofilaments oxydés [8]. On ne sait pas encore si les CL sont une conséquence de la maladie ou encore s'ils sont responsables de la dégénérescence des neurones DAergiques. Toutefois, certaines mutations protéiques, telles que l'AS, entraînent l'accumulation de la protéine dans le CL. L'impact de ces mutations en relation avec la MP est discuté dans la section 1.2.1.

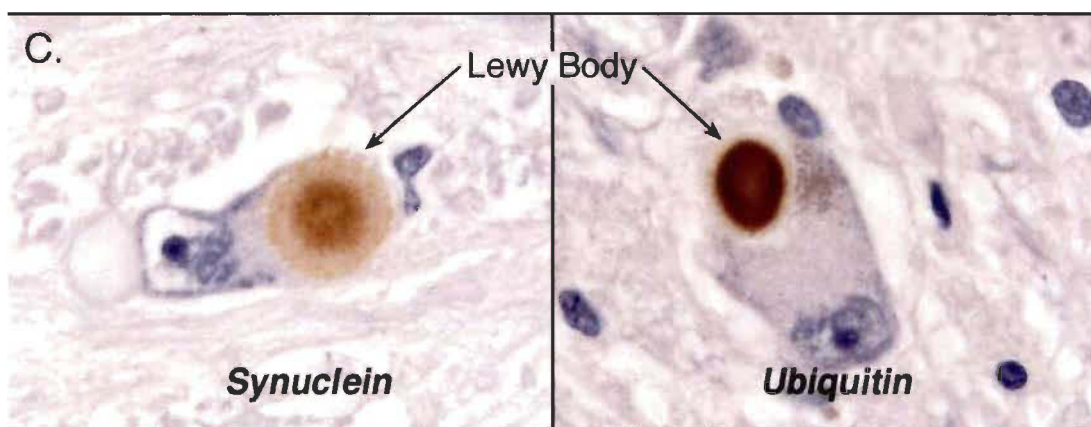


FIGURE 1.7 : Détection des CL

Coloration générale des neurones DAergiques avec l'éosine Gauche: Immunodétection avec un anticorps contre la synucléine Droite: Immunodétection avec un anticorps contre l'ubiquitine [3]

1.1.7.2 Dégénérescence des neurones DAergiques

Les neurones DAergiques fabriquent, emmagasinent et sécrètent la dopamine. Deux enzymes sont responsables de la transformation de la tyrosine en dopamine, il s'agit de la tyrosine hydroxylase (TH) (étape limitante) et de la dopa décarboxylase. On sait maintenant que le niveau d'expression de la TH, du transporteur de la dopamine (DAT) et de la dopamine est diminué dans le cerveau des parkinsoniens [33]. La figure 1.8 démontre qu'une perte sélective des neurones DAergiques est causée par la MP. Les symptômes de la maladie font leur apparition lorsque 60 à 80 % des neurones DAergiques sont détruits [3]. La mort de ces neurones entraîne une diminution dans la production de dopamine, ce qui a un impact au niveau de la motricité. De plus, plusieurs autres fonctions biologiques sont contrôlées par la balance fine entre la quantité de dopamine et d'acétylcholine. Donc, quand l'équilibre est rompu entre ces deux neurotransmetteurs, comme dans le cas de la MP (diminution dopamine), on observe différentes conséquences en lien avec le rôle de chacun de ces deux messagers chimiques. Ce qui explique les symptômes moteurs et non moteurs de la MP.

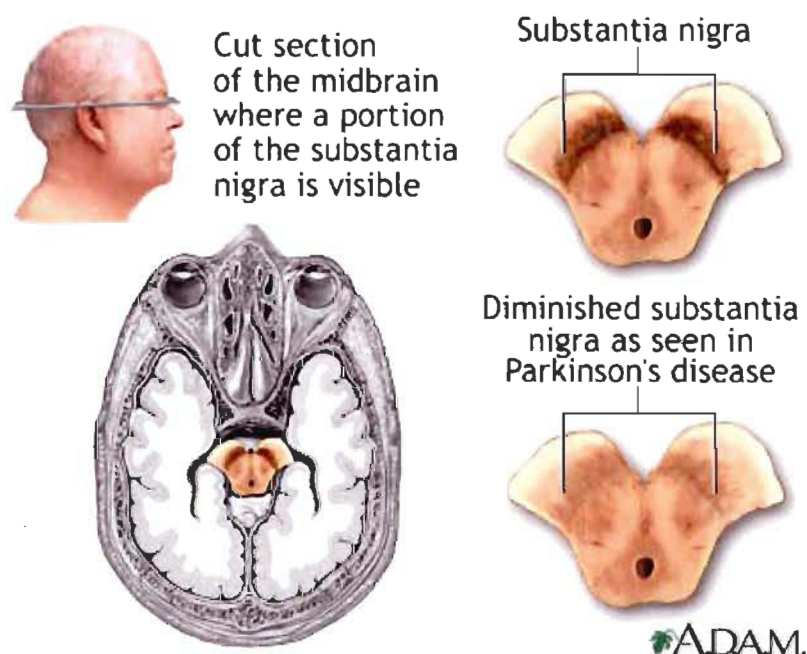


FIGURE 1.8: Diminution de la pigmentation caractéristique de la SN suite à la dégénérescence sélective des neurones DAergiques

(A.D.A.M. About.com)

1.2 Étiologie

La cause de la MP est encore, à ce jour, inconnue. Parmi tous les cas de la MP, seulement 5 % sont d'origine génétique. Pour les 95 % des cas restants, il s'agit de la MP idiopathique, qui signifie qu'il n'y a pas encore de cause connue à cette maladie [34, 35]. Plusieurs indices révèlent toutefois l'implication du stress oxydant dans la genèse de la maladie [36]. Il s'agit de l'hypothèse la plus soutenue à ce jour. Une revue des principales écoles de pensée quant à la cause de la MP, suit dans les prochaines sections.

1.2.1 La MP héréditaire

Selon la société Parkinson du Québec, une personne dont l'un des parents est atteint de la MP a plus de chance d'être elle-même atteinte de la maladie. L'hypothèse génétique découle de la découverte de gènes impliqués dans la MP. Depuis 1997, 4 gènes et 10 locus géniques impliqués dans la genèse de la forme familiale de la maladie ont été identifiés [37]. La figure 1.9 est un schéma explicatif des différents gènes impliqués dans la MP.

1.2.1.1 La protéine de l'alpha synucléine (AS)

Suite à l'analyse d'une grande famille italo-américaine en 1997, dans laquelle la MP se transmettait de façon autosomique dominante, le premier locus (PARK 1) a été découvert sur le gène SNCA du chromosome 4 [38]. Il s'agit d'une mutation sur le gène codant pour l'AS, une protéine impliquée dans la plasticité synaptique et la modulation dynamique de la fonction vésiculaire [38]. Trois mutations différentes à l'AS ont été identifiées (A53T, A30P et E46K) et associées à la MP [38]. Il s'agit de mutations de type gain de fonction causant une accumulation anormale de la protéine AS, ce qui inhibe la fonction du protéasome et qui pourraient être impliquées dans la mort neuronale [32]. L'intérêt de l'AS dans la pathogenèse de la maladie vient aussi du fait que l'AS est le composant principal des CL et ce, même chez les patients qui n'ont pas

de mutation du gène AS. En effet, un marquage immunologique des CL avec un anticorps anti-AS révèle une immunoréactivité intense [37, 38].

1.2.1.2 La protéine Parkine

Des études génétiques ont révélé que 50 % des cas de MP débutant avant l'âge de 40 ans seraient causés par une mutation au locus PARK 2 du gène PRKN, situé sur le chromosome 6 [38]. Cette mutation, découverte en 1998, se transmet de façon autosomale récessive [39]. Le gène PRKN code pour la protéine parkine, est une ubiquitine ligase E3 et intervient dans la dégradation protéique au protéasome [37]. Lorsque cette protéine est mutée, elle entraîne un dysfonctionnement du système de dégradation protéique ubiquitine protéasome.

1.2.1.3 La protéine DJ-1

Suite à l'étude de quatre familles hollandaises et de trois familles italiennes qui étaient touchées par la MP, deux types de mutations de la protéine DJ-1 causant la maladie ont été identifiés [40]. Pour les familles hollandaises, il s'agit d'une délétion des cinq premiers exons ce qui rend la protéine invalide. Alors que pour les familles italiennes, il s'agit du changement de la proline en position 166 à la place d'une leucine (L166P), ce qui modifie la structure du site actif. Le locus PARK 7, identifié en 2001 est transmis de façon récessive. Il s'agit d'une mutation du gène (1p36.23) qui code pour la protéine DJ1. Cette protéine est fortement exprimée dans plusieurs parties du corps, dont le cerveau, et elle appartient à la famille de peptidase C56 [41]. Elle agit comme régulateur de la transcription des récepteurs dépendants de l'androgène. Elle serait aussi une chaperonne « redox-sensitive » et protégerait les neurones contre le stress oxydant et la mort cellulaire [37, 41]. Des données récentes indiquent que DJ1 serait impliquée dans la détoxification des radicaux libres. En effet, cette protéine aurait la capacité d'éliminer le H_2O_2 , une espèce réactive de l'oxygène capable de provoquer un stress oxydant.

1.2.1.4 Le gène PINK-1

Ce gène code pour une protéine sérine/thréonine kinase 1 mitochondriale induite par des « *Phosphatases and TENsin homologs* » (PTEN) et correspond au locus PARK 6 du chromosome 10 [42]. Elle protège les cellules du dysfonctionnement mitochondrial induit par le stress oxydant. Une mutation dans ce gène est responsable de 2 % des cas de la MP à début précoce et est transmise par le mode autosomal récessif [41].

1.2.1.5 La protéine Dardrine

Le gène LRRK2 (locus PARK 8) code pour la dardrine, une protéine kinase 2 riche en répétitions de leucine [42]. Une mutation de ce gène est responsable de 6 à 40 % des cas héréditaires de la MP (en fonction de l'ethnie) et 2 % de la MP idiopathique [43]. Elle se transmet de façon autosomale dominante [44]. Zhu et son équipe ont démontré par immunomarquage, que LRRK2 est présent dans les CL et qu'il est possiblement impliqué dans la formation d'inclusions cytoplasmiques [43]. Cette mutation de LRRK2 est dépendante de l'âge et a un début tardif [42, 43]. La mutation la plus commune de ce gène est la G2019S et elle génère un phénotype indistinguishable de la MP idiopathique. Les patients qui sont atteints par les mutations moins communes de LRRK2, R1441C et Y1699C, présentent une variation de la maladie. En effet, certains patients ayant la mutation LRRK2 ne développent pas de CL ce qui rend difficile la corrélation entre les causes de la MP et les caractéristiques pathologiques. Il y a aussi des variations de la maladie en lien avec la mutation G2019S; certains patients atteints par ce trouble génétique ne développeront jamais la MP. On connaît encore mal les conséquences des mutations de LRRK2, mais certaines études démontrent qu'elle ont un effet sur tau et sur l'AS, deux protéines impliquées dans la MP [42].

1.2.1.5 Le gène UCH-L1

D'autres formes de la MP, qui ont un mode de transmission autosomique dominant, sont moins bien connues. Le locus PARK5 correspond à une mutation au niveau du gène ubiquitine carboxy-terminal-hydrolase L1 [40]. Ce gène code pour une protéine qui a pour rôle d'hydrolyser les segments d'ubiquitine en position carboxyle terminale pour en faire des monomères. Une mutation de cette protéine a des répercussions au niveau de la dégradation protéique au protéasome [32].

1.2.1.6 Les locus PARK 9 et 10

La découverte de ces locus a été faite en 2002, ils sont respectivement localisés au site 1p36 et 1p du chromosome 1. Toutefois, on a encore peu d'information à leur sujet. Ils seraient associés avec une forme très atypique du syndrome parkinsonien, donc probablement de fonction différente des locus PARK 1 à PARK 8 [37, 41].

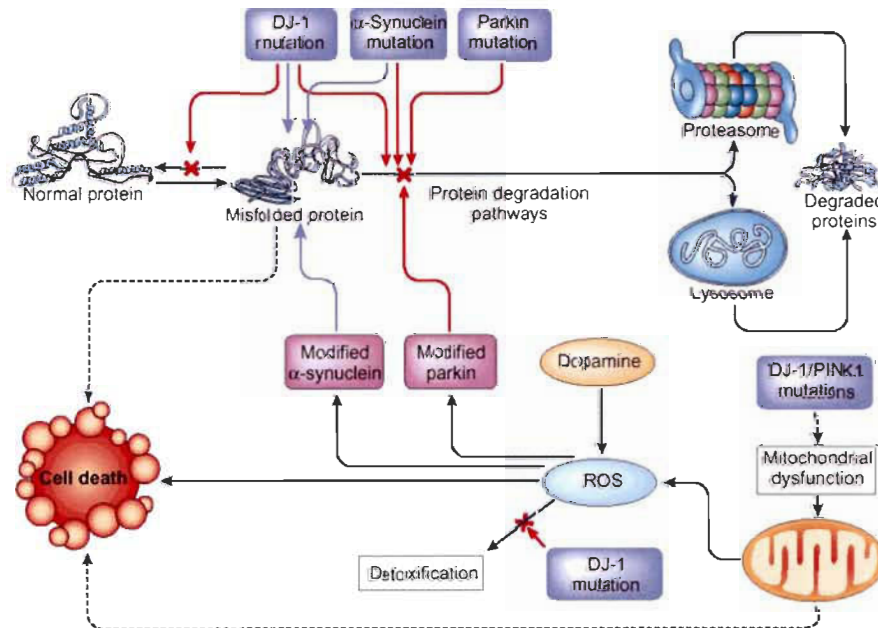


FIGURE 1.9: Schéma de l'implication génétique dans la mort cellulaire du neurone DAergique [45]

1.2.2 La MP idiopathique

Dans la majorité des cas de MP, la cause de la maladie n'est pas attribuable à un défaut génétique, on dit alors que la MP est idiopathique. Il y a plusieurs hypothèses pour expliquer la MP idiopathique, voici les trois principales (qui sont toutes reliées) : stress oxydant, neuroinflammation et facteurs environnementaux (exposition précoce et prolongée à des polluants chimiques, l'intoxication au monoxyde de carbone ou au manganèse, par exemple). Il y a aussi des causes moins fréquentes de la MP telles que les traumatismes crâniens. L'hypothèse de stress oxydant demeure la plus soutenue, aujourd'hui.

1.2.2.1 Le stress oxydant

Les facteurs environnementaux ont été fortement suspectés dans l'apparition de la MP quand plusieurs toxicomanes des États-Unis ont tous développé un syndrome parkinsonien suite à la consommation d'un substitut synthétique d'héroïne. C'est un étudiant en chimie qui a fait une erreur de synthèse et la drogue a ainsi été contaminée par le 1-méthyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, figure 1.10) [46]. Suite à cette découverte, des études ont dévoilé que certaines substances chimiques structurellement semblables au MPTP, l'ion 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), étaient employées comme insecticides (roténone), herbicides (paraquat) ou fongicides (maneb) et causaient aussi la MP [3, 47, 48]. Le MPTP s'est avéré sélectivement toxique pour les neurones DAergiques. Des études sur le MPTP mettent en évidence qu'il est responsable de la formation de radicaux libres et par le fait même, il contribue au développement du stress oxydant dans notre modèle cellulaire. Cette neurotoxine recrée les mêmes caractéristiques neuropathologiques que la MP à l'exception des CL. Certains chercheurs se sont déjà intéressés à ce sujet, mais ils n'ont toujours pas trouvé de CL suite à une exposition au MPTP [49, 50]. Toutefois, des études ont démontré que suite à une exposition au MPTP, il y avait une augmentation dans l'immunoréactivité de l'AS (composant majeur des CL) dans la SN de souris [51, 52]. L'utilisation actuelle du MPTP est le reflet d'un modèle aigu de la MP, alors que la MP est une maladie liée à

l'âge. Il est ainsi possible de penser qu'une exposition à très long terme à de petites doses de MPTP, qui serait alors un modèle chronique de la maladie et causerait la formation de CL. Depuis la découverte de l'implication de cette toxine dans la formation de stress oxydant, le MPTP *in vivo* et son métabolite actif, le MPP+ *in vitro* sont largement utilisés comme modèle de la MP [53]. De nombreuses études confirment que le stress oxydant contribue à la formation de la MP idiopathique [36, 54-58]. Plusieurs changements au niveau du cerveau des parkinsoniens valident l'implication du stress oxydant dans la genèse de la maladie; il y a un changement dans le niveau de fer de la SN, une dysfonction mitochondriale et une modification du niveau des défenses antioxydantes du cerveau, comme l'augmentation de l'expression de la SOD par exemple [56].

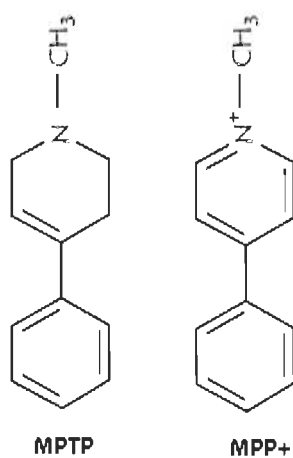


FIGURE 1.10 : Structure du MPTP et du MPP+
(www.neurosci.pharm.utoledo.edu)

1.2.2.1.1 Les radicaux libres (RL)

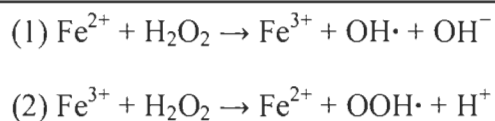
En effet, la dégénérescence des neurones de la SN peut être expliquée par une concentration anormale de RL. Il s'agit de molécules extrêmement réactives qui pour se stabiliser, vont arracher un électron à d'autres molécules, telles que l'ADN, les protéines ou encore les lipides membranaires; ce qui entraîne de graves dommages

biologiques allant jusqu'à la mort cellulaire [3, 29, 32]. De plus, le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydant. Le fait que le cerveau consomme beaucoup d'oxygène, qu'il ait un besoin énergétique élevé, qu'il soit composé en grande partie d'acides gras polyinsaturés, qu'il contient une forte concentration de métaux de transition (par exemple, le fer) et que les défenses antioxydantes soient relativement faibles, expliquent sa vulnérabilité au stress oxydant.

La présence d'un faible taux de RL dans l'organisme est tout à fait normale. Ces molécules toxiques peuvent venir d'une source endogène ou encore exogène. Dans la production de RL endogènes, il y a le métabolisme de l'oxygène, celui de la dopamine et son autooxydation qui sont impliqués. Ensuite, l'exposition à différents facteurs environnementaux (pesticides, métaux lourds, toxines, etc) entraîne la formation de RL exogènes [4]. Notre organisme est capable de faire face à ces molécules toxiques lorsqu'elles sont présentes à de faibles concentrations, et ce, grâce à la présence d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione (GSH), ou encore grâce à l'apport alimentaire en antioxydants (par exemple, la vitamine E). Par contre, lorsque le niveau de RL augmente, il se crée un déséquilibre entre les RL et les antioxydants, ce qui conduit à l'état de stress oxydant et entraîne la mort cellulaire.

1.2.2.1.2 Le fer

Il y a une augmentation sélective de 40 % du niveau de fer dans la SN de cerveaux parkinsoniens par rapport à un cerveau normal. Ce qui implique qu'il y a davantage de fer réactif pour favoriser la formation de RL par la réaction de Fenton (équation 1.1) [54, 56]. Selon la réaction de Fenton, l'interaction du H_2O_2 avec le fer entraîne la formation de RL toxiques.



Équation 1.1 : Réaction de Fenton

[1.1]

1.2.2.1.3 Dysfonction mitochondriale

La découverte de l'implication d'une dysfonction mitochondriale dans la MP a été faite suite à la celle du MPTP. En effet, les recherches sur cette neurotoxine ont rapidement dévoilé son mode d'action. Le MPTP est capable d'accéder au cerveau, car il a la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une fois dans le cerveau le MPTP est converti en MPDP⁺ (1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium) par la monoamine oxydase B dans les astrocytes. Une oxydation spontanée du MPDP⁺ produit le métabolite actif toxique, le MPP⁺. La figure 1.12 démontre que le MPP⁺ est ensuite capturé par les neurones DAergiques via son affinité pour le DAT. Le MPP⁺ est ensuite transporté dans les mitochondries où il interfère avec la respiration mitochondriale en inhibant le complexe 1 de la chaîne respiratoire; ce qui cause une augmentation de la production de RL responsables de la formation de stress oxydant et de l'activation des voies moléculaires de la mort cellulaire programmée dans les neurones DAergiques [53]. Le MPP⁺ libère aussi la dopamine des vésicules vers le cytoplasme où elle s'auto-oxyde et génère à son tour des ROS.

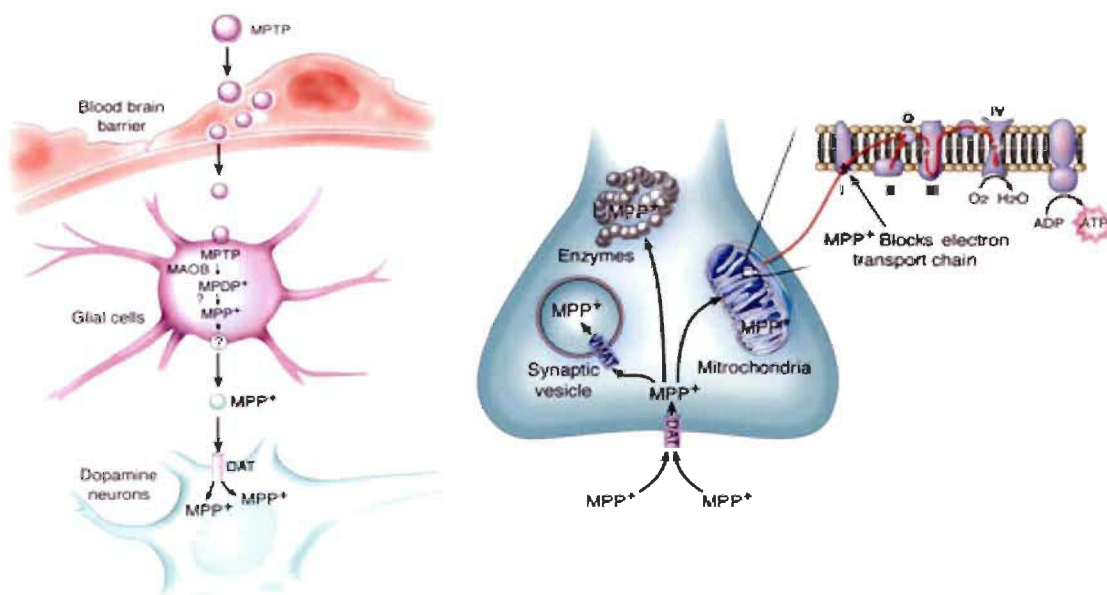


FIGURE 1.11 : Transformation du MPTP en MPP⁺ et entrée du MPP⁺ dans les neurones DAergiques [3]

Des études *post mortem*, sur des cerveaux humains ont démontré que la MP est aussi accompagnée d'une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale [56]. Cette dysfonction de la chaîne de transport des électrons engendre une perte d'énergie et la formation de RL [58]. Normalement, presque tout l'oxygène moléculaire est consommé par la mitochondrie et de puissants oxydants sont générés comme sous produits de la réaction. L'inhibition du complexe I mitochondrial augmente la production de ces puissants oxydants, le H_2O_2 et le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), qui sont susceptibles de former le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) ou encore de réagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) [3]. Ce dernier est un puissant oxydant impliqué dans plusieurs maladies neurologiques.

1.2.2.1.4 La peroxydation lipidique

Il s'agit d'un processus par lequel des RL arrachent des électrons aux lipides des biomembranes, ce qui cause des dommages cellulaires. Certains indices tels que l'augmentation du niveau de malondialdéhyde et l'augmentation du niveau d'hydroperoxydes instables confirment qu'il y a une hausse, dans la SN des cerveaux parkinsoniens, du niveau de peroxydation lipidique[56], responsable de la diminution de la fluidité membranaire. Il y a aussi d'autres indices de dommages oxydatifs cérébraux dans la MP tels que l'oxydation de protéines ou encore de l'ADN [54].

1.2.2.1.5 La dopamine (DA)

L'auto-oxydation de la DA est aussi en cause dans la formation de stress oxydant. En effet, l'auto-oxydation de la DA conduit à la formation de semi-quinones dans la voie de synthèse de la neuromélanine. Les quinones sont des molécules qui endommagent les protéines en réagissant avec les résidus cystéine [3, 59]. En effet, les quinones DAergiques réagissent, par une réaction d'addition nucléophile, avec les groupements sulfhydryl libre des résidus cystéines présents sur les protéines, causant ainsi la formation de 5-cystenil-DA. Ces derniers se retrouvent principalement au niveau des sites actifs des protéines. Le nouveau groupement ainsi ajouté au niveau du site actif

inhibe souvent la fonction de la protéine, ce qui cause des dommages cellulaires voire même la mort [59]. L'auto-oxydation de la DA engendre également la formation d'espèces réactives de l'oxygène, et est associée à la dégénérescence des neurones DA. De plus, l'augmentation du métabolisme de la DA (figure 1.12), par la monoamine oxydase, est impliquée dans la genèse de stress oxydant. En effet la déamination de la DA génère de l'acide homovanillique et de l'acide 3,4-dihydroxy-phénylacétique, mais aussi du H_2O_2 . Normalement, le H_2O_2 est éliminé par la voie de la GSH, mais il peut être transformé en $OH\cdot$ hautement toxique par la réaction de Fenton et ainsi causer la peroxydation lipidique et engendrer la mort cellulaire [55]. La neuromélanine en présence de fer, par la réaction de Fenton, est aussi source de $OH\cdot$ [34].

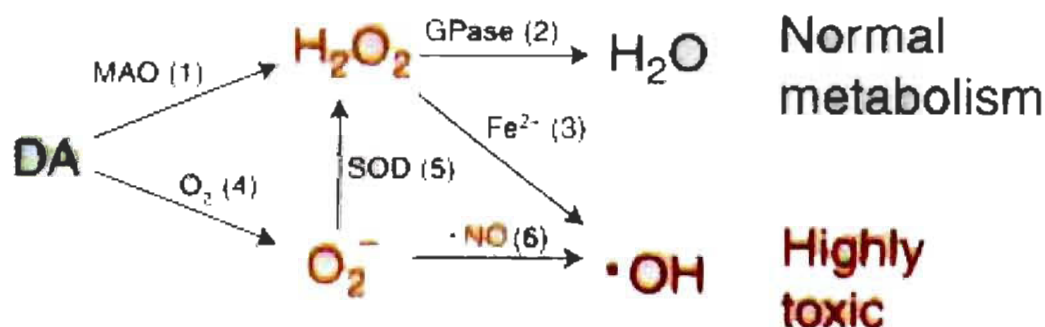


FIGURE 1.12 : Conséquence de l'augmentation du métabolisme de la DA chez les parkinsoniens.

1.2.2.2 Défenses antioxydantes

L'activité de certaines enzymes antioxydantes est la même pour une personne normale et un parkinsonien alors que l'activité de certaines autres enzymes est grandement modulée. Des études montrent que le niveau d'activité de la SOD est augmenté dans la SN des patients atteints de la MP. La SOD (EC 1.15.1.1) est une enzyme qui catalyse la transformation de l' $O_2^{\cdot-}$ en oxygène et en H_2O_2 (équation 1.2). Étant une enzyme très importante pour l'élimination des RL, l'augmentation de l'activité de la SOD chez les parkinsoniens peut être un moyen de compenser pour la hausse dans la formation de RL [54].



Équation 1.2 : Réaction catalysée par la SOD [1.2]

Un autre changement important dans la SN des patients atteints de la MP est une diminution de la glutathione peroxydase (GPX), ce qui contribue au stress oxydant [54]. La GSH (forme réduite) ou GSSG (forme oxydée) agit comme oxydoréducteur et permet l'échange d'électron dans la cellule (EC 1.11.1.9). L'équation ci-dessous montre que cette enzyme catalyse la réduction d'hydroperoxydes (ROOH et H₂O₂). Ainsi, la GPX joue un rôle important dans la détoxification du H₂O₂.



Équation 1.3 : Réaction catalysée par la GPX [1.3]

Par contre, le niveau d'activité de la catalase (EC 1.11.1.6) demeure stable chez les parkinsoniens [54]. Cette enzyme est responsable de la dismutation du H₂O₂ (équation 1.4). Par cette réaction, le H₂O₂ est converti en eau et en oxygène, deux molécules plus stables.



Équation 1.3 : Réaction catalysée par la catalase [1.4]

En temps normal ces enzymes sont capables d'éliminer les RL qui sont formés de façon endogène et normale. Il y a aussi notre alimentation qui fournit des antioxydants (vitamines E et C) qui aident à éliminer les RL présents dans notre corps. Toutefois, lorsqu'une augmentation dans le niveau de RL est présente, comme dans le cas de la MP, l'équilibre est brisé entre la formation et l'élimination des RL et les dommages oxydatifs apparaissent [56].

1.3 Traitements pour la MP

De nos jours, la médecine traite les symptômes de la MP avec assez de succès. On peut vivre avec la maladie pendant plusieurs années bien que la qualité de vie soit diminuée. Cependant, il n'y a encore aucun moyen de guérir cette maladie. La section suivante explique les différentes options de traitements possibles pour un malade atteint de la MP.

1.3.1 La L-DOPA

Pour pallier le manque en DA qui cause les symptômes de la MP, on ne peut pas tout simplement prendre un comprimé de DA, car elle est détruite par l'acidité de l'estomac et elle est incapable de passer la BHE. La molécule précurseur de la DA, le Lévo-Dihydroxy-phénylalanine (L-DOPA), lui en est capable [17]. Le L-DOPA est le traitement le plus utilisé en clinique. La L-DOPA est transformée en DA par la dopa-décarboxylase (figure 1.13). Toutefois lorsqu'elle est administrée seule, seulement 1 % de la L-dopa absorbée se rend au cerveau. La balance étant métabolisée ailleurs dans le corps. Ainsi, les traitements d'aujourd'hui, comme le Sinemet, combine la L-DOPA à un inhibiteur de la décarboxylase périphérique (ex : Carbidopa); ce qui aide à prévenir le métabolisme de la L-DOPA avant qu'elle n'atteigne les neurones DAergiques. Dans d'autres médicaments (Stalevo), on combine en plus un inhibiteur de catéchol-o-méthyle transférase (Entacopone), ce qui permet de prolonger l'effet de la L-DOPA [17].

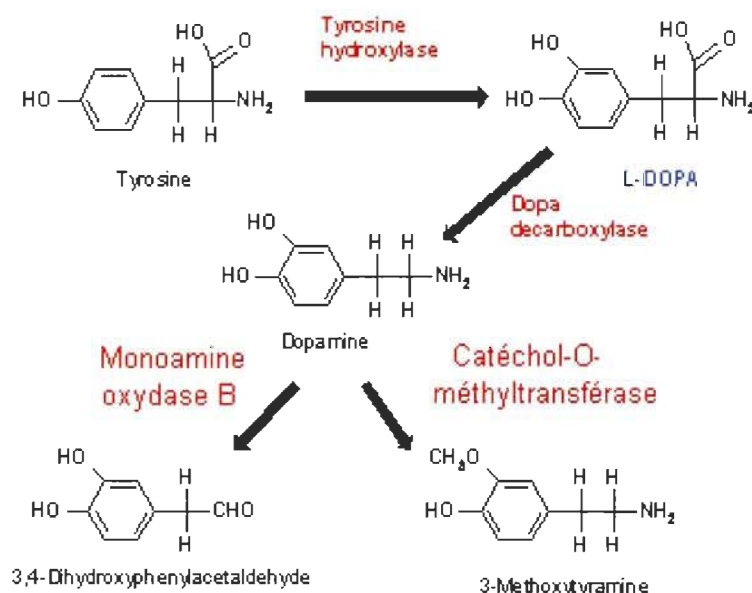


FIGURE 1.13 : Anabolisme et catabolisme de la DA chez l'humain

La L-DOPA est un traitement efficace, mais son utilisation à long terme entraîne aussi des effets néfastes. Au fil des années, les patients ressentent une fluctuation des performances motrices qui deviennent de plus en plus invalidantes. On appelle effet « ON-OFF » le changement brutal des performances motrices d'un patient reliées au traitement avec la L-DOPA. Le patient a deux états moteurs complètement différents « ON » pour bien être moteur et « OFF » pour retour des symptômes [17]. Ces deux états se succèdent de façon brutale comme le fait d'allumer ou d'éteindre une lumière en appuyant simplement sur l'interrupteur. De plus, suite à un traitement à long terme de L-DOPA, la majorité des patients parkinsoniens vont aussi développer des dyskinésies. Il y a deux formes de ces mouvements anormaux involontaires : la chorée (mouvement bref et répétitif) et la dystonie (spasme musculaire) [17].

1.3.2 Les agonistes DAergiques

Il s'agit de composés qui miment l'action de la DA et reproduisent l'effet sur les récepteurs DAergiques. Les avantages de cette classe de médicaments sont qu'ils ont une longue durée d'action, ils sont spécifiques d'un récepteur DAergiques et ils n'ont pas besoin des neurones DAergiques pour agir. De cette façon, la perte des neurones DAergiques engendré par la MP n'affecte pas le rendement de ce traitement [17]. Voici quelques exemples d'agonistes DAergiques les plus utilisés: bromocriptine, cabergoline et quinpirol. Toutefois, à long terme, ces composés rendent les récepteurs DAergiques moins sensibles. Ils sont aussi responsables d'autres effets secondaires tels que des nausées, de l'hypotension artérielle et des troubles moteurs [17].

1.3.3 Les anticholinergiques

La contraction musculaire des parkinsoniens est due au fait la perte des neurones DAergiques cause une diminution de l'activité DAergiques, ce qui a pour effet de créer un déséquilibre entre le niveau d'activité du système cholinergique et le niveau d'activité du système DAergique. Par le fait même, le système cholinergique devient plus actif que le système DAergique, ce qui cause la contraction musculaire. Le traitement à l'aide des antimuscariniques (anticholinergiques) tels que la benztropine, réduit la fonction cholinergique. Ce type de traitement soulage les symptômes de la MP, particulièrement les tremblements [17].

1.3.4 Les traitements chirurgicaux

Les avancées technologiques et les connaissances sur le fonctionnement des ganglions de la base ont permis de développer la **stimulation profonde du cerveau** (SPC) [60]. La SPC consiste en l'implantation d'électrodes, dans le noyau subthalamique, reliées à un générateur de pulsations qui est contrôlé de l'extérieur (figure 1.14). Cette chirurgie donne de bons résultats et permet une réduction de

l'utilisation de L-dopa et des autres drogues, ce qui diminue les mouvements involontaires. Cette intervention aide aussi à soulager la fluctuation des symptômes parkinsoniens, diminuer les tremblements, la lenteur des mouvements et les troubles de marche [61]. Par contre, la SPC est une chirurgie très coûteuse qui nécessite une programmation attentionnée du stimulateur, de façon individualisée pour chaque patient.

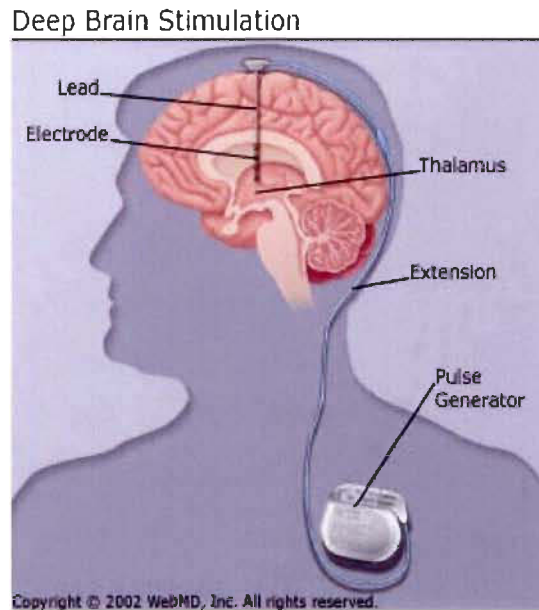


FIGURE 1.14 : Stimulation profonde du cerveau

La **thérapie génique** est encore sous étude. Cette technique utilise un vecteur viral inoffensif pour faire entrer un gène dans la SN du mésencéphale. Chez les parkinsoniens, l'acide gamma-amino butyrique (GABA) qui est un neurotransmetteur inhibiteur dont la concentration est à la baisse dans une partie du cerveau dénommée noyaux subthalamiques [62]. L'inhibition due à l'activité du GABA étant à la baisse, cette région du cerveau est hyperactive. Le vecteur injecté pour la thérapie génique est responsable de la production d'une enzyme, la glutamique acide décarboxylase qui catalyse la production du gaba, qui est l'inhibiteur des cellules suractivées dans la MP [1, 62].

Une autre méthode qui donne de résultats préliminaires impressionnants consiste en l'implantation dans le cerveau de cellules souches modifiées *in vitro* pour qu'elles

produisent de DA. Par contre, cette méthode ne tient pas compte de la perte considérable des enzymes nécessaire à la synthèse de DA chez les parkinsoniens [1].

1.3.5 Les thérapies préventives

Les études sur la MP ont clairement démontré l'implication du stress oxydant dans l'apparition de la maladie. La thérapie préventive est un moyen de contrer l'état de stress oxydant au niveau du cerveau, en donnant à notre système des antioxydants capables de combattre les molécules toxiques pour notre organisme; les RL. En effet, depuis quelques années, les antioxydants font l'objet de nombreuses recherches en ce qui concerne le traitement de la MP. Par exemple, l'oestrogène a récemment fait l'objet d'études afin de vérifier son potentiel en tant que substance antioxydante. L'oestrogène s'est avéré très efficace dans la capture des RL [63]. En effet, on sait maintenant que l'oestrogène est impliqué dans la neuroprotection et que la plupart des actions physiologiques de l'oestrogène sont médiées par les récepteurs oestrogéniques alpha et bêta (ER α , ER β) [63]. Les deux types de récepteurs sont présents dans le cerveau mais il y a encore des controverses à savoir lequel de ces deux récepteurs est responsable de la neuroprotection [13, 63, 64]. Malheureusement lorsque l'oestrogène est administré à forte dose, il conduit aussi à de graves effets secondaires tels que les cancers hormonaux dépendants [8, 13, 65, 66]. Depuis ces découvertes, l'intérêt pour des molécules antioxydantes a beaucoup augmenté. Notre laboratoire étudie présentement le potentiel neuroprotecteur de certaines substances, ayant une structure semblable à l'oestrogène, les phytoestrogènes. Ces derniers ont beaucoup moins d'effets secondaires hormonaux dépendants que les oestrogènes classiques [67]. Pour ma part, mon projet de recherche a été dirigé sur l'étude de la sésamine (figure 1.16), un phytoestrogène de la classe des lignans.

1.4 La sésamine

Le sésame (*Sesamum indicum*) est une plante oléagineuse qui fait partie de la famille des Pédaliacées. Elle est une des premières plantes à partir de laquelle on a extrait de l'huile comestible. Les graines de sésame sont constituées à 50 % d'huile, 20% de protéine et elles contiennent aussi des lignans, dont la sésamine, le sésamolin et des sésaminoles glycosides. Le lignan majoritaire dans les graines et l'huile de sésame est la sésamine [68, 69]. Les lignans sont classés comme des phytoestrogènes car ils peuvent mimer certains effets de l'oestrogène [70]. Ce type de composé peut aussi avoir des activités antiestrogéniques. La sésamine (figure 1.15) est un composé chimique de type poly-phénoliques naturellement présent dans certains végétaux tels que dans les graines (sésame), les céréales à grains entiers, les fruits (baies, cerises, pommes, poires), les légumes (courges, carottes, fenouils, céleris, ails, oignons) et le thé [70-72].

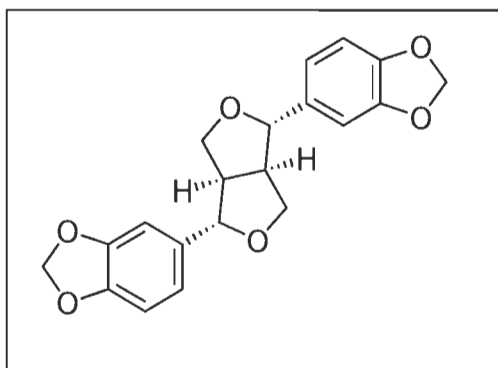


FIGURE 1.15 : Structure de la sésamine [19]

1.4.1 Métabolisme de la sésamine

La sésamine est un composé liposoluble, elle est donc capable de passer la BHE. Dans la nature, la sésamine est principalement retrouvée sous la forme libre, alors que les dérivés glycosides sont minoritairement retrouvés [73]. Suite à l'administration orale de sésamine, il y a une augmentation de sa concentration au niveau du cerveau 3h après son ingestion, tandis que le pic de concentration dans le cerveau est après 6h [74].

Toutefois, la plupart de la sésamine ingérée est absorbée par la lymphe et est conduite au foie, d'où elle est distribuée aux différents tissus. Il n'y a plus aucune trace de sésamine dans le corps 24h après sa consommation. En effet, la sésamine est métabolisée en entérodiole et en entérolactone par la flore intestinale [75].

1.4.2 Effet antiviellissement de la sésamine

Depuis des milliers d'années, le sésame et l'huile de sésame font partie de la médecine traditionnelle des pays orientaux. Un vieux texte daté de 1,552 av. J.-C. décrit l'effet médicinal du sésame comme une source d'énergie. Un autre texte, tiré d'un livre chinois, (300 av. J.-C.) décrit que le sésame est un bon aliment ayant plusieurs effets physiologiques, particulièrement utiles pour fournir de l'énergie, une disposition d'esprit tranquille et prévient le vieillissement s'il est consommé pendant une longue période [69]. La consommation de sésame sous toutes ses formes est reconnue pour prévenir le vieillissement surtout en Chine et au Japon. Toutefois, il n'y avait aucune donnée scientifique qui supportait ces croyances. Puis en 1990, une première étude a été faite pour vérifier l'effet antiviellissement du sésame à l'aide de souris dont le vieillissement est accéléré. Une diète contenant 20 % de sésame ralentit effectivement le vieillissement, diminue la peroxydation lipidique et augmente l'activité de la SOD [69, 76].

1.4.3 Caractère anti-cancer de la sésamine

La sésamine, contrairement à l'oestrogène, a la capacité d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses humaines, telles que les cellules du cancer du sein. L'arrêt de la croissance de ces cellules cancéreuses se fait à la phase G1 et elle est due à l'augmentation de la dégradation de la cycline D1 au protéasome par la sésamine. La cycline D1 est un proto-oncogène qui est surexprimé dans plusieurs cellules cancéreuses humaines [77].

1.4.4 La sésamine diminue le cholestérol sanguin

Le métabolisme des acides gras est régulé par l'effet hypocholestérolémique de la sésamine [78]. En effet, la sésamine affecte le métabolisme des lipides en diminuant l'absorption du cholestérol par le petit intestin (ce qui contribue à diminuer le cholestérol sanguin) et diminue l'activité de deux enzymes impliquées dans la synthèse de cholestérol, la 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase et la $\Delta 5$ désaturase [74, 79]. Elle augmente l'expression de 36 gènes codants pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides [80]. Elle supprime aussi l'accumulation du cholestérol dans le foie de rats et de hamster [81, 82]. La sésamine diminue aussi le risque d'artériosclérose chez l'humain en diminuant les lipoprotéine de basse densité (LDL) qui sont responsables du transport du cholestérol vers les cellules [83] et elle régule aussi le ratio oméga 6/oméga 3 pour le garder dans les valeurs normales [69].

1.4.5 La sésamine inhibe l'activation de cellules microgliales induites par le lipopolysaccharide

La production de NO est générée par le lipopolysaccharide (LPS) dans des cellules microgliales. La sésamine diminue l'accumulation de nitrite et inhibe les cytokines induites par le LPS en supprimant la protéine kinase p38 « mitogen-activated protein kinase » et le facteur nucléaire- κ B respectivement [84]. Ainsi, elle inhibe l'activation des cellules microgliales activées par le LPS *in vitro*. La sésamine diminue IL-1b, PGE1, PGE2 et la thromboxane et augmente IL-10 ; l'ensemble de ces effets augmente la survie cellulaire [69].

1.4.6 La sésamine protège le foie contre les dommages induits par la consommation d'alcool

Plusieurs études ont établi que la sésamine diminue les effets néfastes causés par la consommation d'alcool. La sésamine augmente l'expression du gène de l'aldéhyde déshydrogénase, responsable du métabolisme de l'alcool [80]. Ce lignan accélère le retour de la température faciale vers des valeurs normales suite à son augmentation due à la prise d'alcool, diminue la relaxation musculaire, augmente la vitesse de la décomposition de l'alcool dans le foie [85] et diminue les fluctuations du rythme cardiaque [69, 86].

1.4.7 Effet anti-hypertensif de la sésamine

La sésamine possède aussi une activité anti-hypertensive. En effet, la sésamine supprime la haute tension chez des rats souffrant d'hypertension [87]. Des études cliniques faites sur des humains souffrants d'hypertension démontrent qu'une consommation de l'huile de sésame diminue effectivement la tension artérielle et les lipides sanguins [88].

1.4.8 Caractère antioxydant de la sésamine

Depuis très longtemps, l'huile de sésame est reconnue pour sa stabilité. Dans l'Égypte ancienne, l'huile de sésame était utilisée dans la momification, car elle était considérée résistante face à la dégradation oxydative [69]. Aujourd'hui, cette croyance est confirmée par des recherches scientifiques dans lesquelles plusieurs sortes d'huiles végétales ont été entreposées à 60 °C dans un contenant ouvert. L'huile de sésame est demeurée stable après 50 jours alors qu'il y a eu une augmentation rapide de la dégradation oxydative en 10 jours pour les autres huiles végétales [69, 89]. Ce

caractère antioxydant peut être expliqué par la présence de plusieurs molécules actives telles que le sésamol, le γ -tocophérol et la sésamine [69].

La sésamine exerce son pouvoir antioxydant de plusieurs façons. *In vitro* elle a la capacité d'éliminer les RL grâce à la présence de groupements dioxy-méthylènes [90]. La sésamine exerce aussi plusieurs activités antioxydantes physiologiques. Chez l'humain, la consommation de sésame, contenant des lignans maintient le niveau de la vitamine E dans l'organisme, permettant ainsi de profiter plus longtemps des bienfaits de cette vitamine [72]. Il est reconnu que le métabolisme de la sésamine génère de puissants antioxydants de type polyphénols, tels que l'entérolactone et l'entérodiole [68, 69, 71, 91]. De plus, la sésamine augmente *in vivo* l'expression d'une enzyme responsable de la défense antioxydante, la SOD, et la sésamine inhibe aussi la peroxydation lipidique [71, 92].

1.5 Mes objectifs de recherche

La MP est une maladie dont la cause est encore inconnue, toutefois comme il a été mentionné précédemment dans ce chapitre, de plus en plus d'observations suggèrent l'implication du stress oxydant dans la mort des neurones DAergiques. Ainsi, mon but premier était de vérifier si la sésamine avait la capacité de diminuer la mort cellulaire induite par une neurotoxine oxydante sur des neurones DAergiques en culture.

Comme mentionné plus tôt, le stress oxydant génère des RL qui causent des dommages cellulaires et conduisent à la mort des cellules. Ainsi, pour mon deuxième objectif, j'ai étudié la capacité de la sésamine à diminuer le niveau de RL suite à l'induction d'un stress oxydant sur des neurones en culture. J'ai aussi évalué le niveau d'activité de la SOD, une enzyme impliquée dans la détoxification des RL.

Mon troisième objectif avait pour but de vérifier si la sésamine agissait aussi sur les récepteurs oestrogéniques pour générer la neuroprotection comme l'œstrogène le fait.

J'ai alors vérifié le potentiel oestrogénique de la sésamine en étudiant le niveau d'expression des ERs α et β .

De plus, j'ai examiné l'effet de la sésamine sur l'intégrité des neurones DAergiques. Sachant que certains marqueurs DAergiques sont à la baisse chez un parkinsonniens, j'ai évalué la capacité de la sésamine à modifier les trois principaux marqueurs d'identité neuronale DAergique : DAT, TH et la DA.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le milieu de culture RPMI 1640, la gentamicine, la sésamine, le facteur de croissance du nerf 7S (NGF), la dihydrorhodamine-123 (DHR), l'anticorps anti-TH, les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris couplés à une peroxydase, le MPP⁺ et le « Genelute mammalian total RNA extraction kit » ont été achetés chez Sigma Chemicals. Les anticorps primaires anti-ER- α et anti-ER- β proviennent respectivement de chez Stressgen Biotech et Calbiochem. Les anticorps secondaires couplés à un colorant fluorescent rouge CY5 « cyanine » ont été achetés chez BioCan. Le « Prolong Antifade Kit » a été acheté de chez Molecular Probes. Nous nous sommes procuré les réactifs pour la transcription réverse chez New England Biolabs et ceux pour la réaction de polymérisation en chaîne « Fast PCR Master Mix » chez Fermentas. Les sérums de cheval (HS) et de bovin fœtal (FBS) ont été achetés chez Invitrogen. Nous avons acheté la trousse de dosage de la DA chez Rocky Mountain Diagnostics et celle du dosage de la LDH chez Roche Diagnostics.

2.1 Culture cellulaire et traitement

Dans le cadre de l'étude d'une maladie neurodégénérative telle que la MP, nous avons choisi d'utiliser comme modèle cellulaire des PC12 (American Type Culture Collection, ATCC). Il s'agit d'une lignée cellulaire, issue d'un phéochromocytome de rat, ayant la capacité d'acquérir un phénotype neuronal. De ce fait lorsqu'on ajoute du NGF au milieu de culture, les PC12 qui étaient originalement natives, développent des

excroissances neuronales. Par conséquent, ces cellules adoptent un nouveau phénotype et se différencient en neurone d'où l'appellation cellules différenciées.

L'intérêt d'utiliser cette lignée cellulaire vient du fait que ces cellules ont plusieurs caractéristiques des neurones qui sont atteints par la MP, c'est-à-dire les neurones DAergiques. En effet, ces cellules sont catécholaminergiques ce qui signifie qu'elles synthétisent, emmagasinent et relâchent de la DA et de la norépinéphrine. Les PC12 expriment aussi les deux récepteurs de la DA (D1, D2), son transporteur et d'autres types de récepteurs d'intérêt tels que les ER α et β . Il est important de mentionner que les PC12 expriment le ER- α seulement si elles sont différenciées, donc après plusieurs jours de traitement avec le NGF.

Les PC12 ont été maintenues dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ à une température de 37 °C. Les cellules natives (figure 2.1) ont été mises en culture dans du RPMI-1640 « Roswell Park Memorial Institute medium » sans rouge de phénol, additionné de 5 % de FBS et de 10 % HS, tous deux décomplémentés à la chaleur. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Pour induire le phénotype neuronal, les cellules ont été traitées avec du NGF (50 ng/ml) dans du RPMI contenant 1 % de FBS pour une période de huit jours et le milieu de culture est changé aux deux jours. Le FBS 1 % a été utilisé pour empêcher les PC12 de se diviser et ainsi leur permettre de se différencier. Après sept jours de différenciation (figure 2.1), du milieu 1 % FBS désactivé au charbon a été ajouté afin d'éliminer les stéroïdes du milieu de culture, avant d'effectuer le traitement.



FIGURE 2.1 : Cellules PC12
Gauche : cellules PC12 natives, Droite : Cellules PC12 différenciées

Afin de vérifier l'effet de la sésamine sur les PC12 en état de stress oxydant, les cellules ont été prétraitées pour 3h avec de la sésamine à une concentration de 1 pM. Après 3h, de la sésamine a été rajoutée afin de maintenir la concentration malgré l'ajout de la solution contenant la toxine, c'est-à-dire le MPP⁺ (5mM), qui lui, a été ajouté pour une période de 24h (figure 2.2) [93]. Toutes les conditions expérimentales ont été sélectionnées suite à des analyses cinétiques et des doses réponses, déjà effectuées au laboratoire.



FIGURE 2.2 : Schéma explicatif de la procédure de traitement des cellules en culture

2.2 Cytotoxicité

Afin de vérifier l'effet neuroprotecteur de la sésamine, nous avons utilisé une trousse de détection de la cytotoxicité. Il s'agit d'un test colorimétrique utilisé, pour quantifier la mort cellulaire, basé sur la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) [66, 94]. La LDH est une enzyme cytoplasmique, ainsi quand une cellule meurt

ou est endommagée, la LDH est relâchée dans le surnageant. Il est donc possible de quantifier la mortalité cellulaire par le dosage de l'activité enzymatique de la LDH présente dans le surnageant. Dans notre cas, les cellules PC12 ont été cultivées dans 200 μL sur des plaques de 96 puits, ce qui permet de faire plusieurs répétitions d'un même traitement. Pour chaque condition, un minimum de six répétitions ont été effectuées. Suite au traitement des cellules avec la sésamine et/ou la toxine, 100 μL de surnageant a été prélevé de chacun des puits. Le surnageant contient une quantité de LDH qui est proportionnelle à la mortalité cellulaire. En effet, plus il y a de mortalité cellulaire, plus il y a de la LDH qui est relâchée dans le surnageant. L'activité de la LDH dans le surnageant a été dosée à l'aide d'un test enzymatique. Pour ce test, on a ajouté au surnageant du lactate, du sel de tétrazolium, du NADH^+ et un catalyseur fournis dans le kit de Roche. Ainsi, la LDH présente dans le surnageant catalyse la conversion du lactate en pyruvate de façon proportionnelle à sa concentration. Cette réaction est accompagnée de la conversion concomitante du NADH^+ en NADH^+H^+ . Le NADH^+H^+ obtenu va donner ces deux électrons au sel de tétrazolium. Ce dernier est ainsi réduit en sel de formazan qui est rouge et absorbe à 490nm. On peut ainsi quantifier la quantité de formazan formée au cours de la réaction qui est proportionnelle au nombre de cellules lysées. La figure 2.3 est un schéma explicatif de la réaction colorimétrique. Pour déterminer le pourcentage de mort cellulaire, il suffit de soustraire la valeur de la mortalité de base et d'en faire ensuite le rapport avec la mortalité maximale, comme le démontre l'équation 2.1. Pour déterminer la mortalité de base, nous avons utilisé du milieu de culture de cellules n'ayant subi aucun traitement, alors que la valeur de mortalité maximale a été obtenue à l'aide d'un détergent qui perméabilise toutes les membranes, le Triton-X 100.

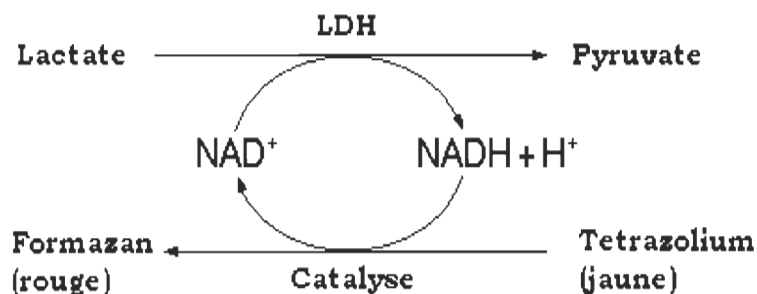


FIGURE 2.3 : Réaction colorimétrique du dosage de la LDH

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Valeur expérimentale} - \text{Mortalité de base}}{\text{Mortalité maximale} - \text{Mortalité de base}} \times 100 \quad [2.1]$$

Équation 2.1 : Équation pour obtenir le pourcentage de cytotoxicité cellulaire lors du dosage de la LDH.

2.3 Évaluation du niveau d'espèces réactives de l'oxygène par la technique de la dihydrorhodamine (DHR)

Le pouvoir antioxydant de la sésamine en présence d'un stress oxydant a été évalué à l'aide de la DHR. La DHR est une molécule non fluorescente qui a la capacité d'entrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, la DHR est oxydée par la présence d'espèces oxydantes, telles que $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le ONOO^- , en rhodamine 123 qui est fluorescente (figure 2.4) [95]. Une version légèrement modifiée d'un protocole déjà décrit [66] a été utilisée. Brièvement, la solution de DHR de 28.9mM a été préparée dans l'éthanol et les aliquotes ont été conservés à -20°C . Les cellules ont été lavées au PBS, puis 250 μL de la solution de travail de DHR (10 μM) ont été ajoutés pour 20 minutes à 37°C . Cette solution a été faite avec du tampon (90mM chlorure de sodium, 50mM sodium phosphate, 5mM chlorure de potassium) bullé à l'azote afin d'éliminer l'oxygène. Suite à un lavage au PBS, les lamelles ont immédiatement été observées avec un microscope à fluorescence Orthoplan (Leitz), les photos ont été prises à l'aide d'une caméra Qimaging (Nikon). La longueur d'excitation était 480 nm et la longueur d'onde d'émission était environ 520 nm, ce qui correspond à une émission de couleur verte. Une analyse de l'intensité relative de la fluorescence en fonction de la surface des cellules était effectuée avec le logiciel NIS-Element BR 2.10.

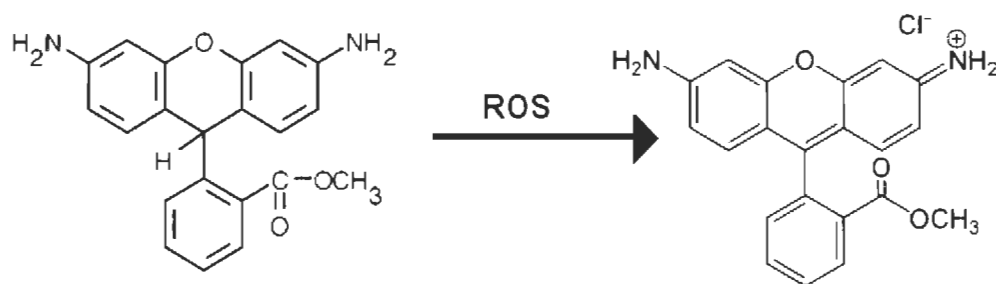


FIGURE 2.4 : Oxydation de la DHR en rhodamine 123 par la présence d'espèces réactives de l'oxygène.

2.4 Réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

L'ARN total a été extrait par le « Sigma GenElute extraction kit ». L'ARN a été quantifié avec un spectromètre pour chaque condition et 1 µg d'ARN total a été rétro-transcrit à l'aide de 25 U of M-MuLV reverse transcriptase, 1.5 µM dNTP et 10 µM d'examères aléatoires. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de chaque mARN cible et celui du 18S (contrôle interne) a été effectuée en utilisant 4 µL de la solution de cDNA, 10 µL de HotMasterMix et 0.2 µM de chaque amorce (sens et antisens) dans un volume total de 20 µL. Les amorces ont été synthétisées chez Sigma Génosys (Oakville, ONT.) et les séquences du ER-β et de DAT proviennent de la littérature [96-98] respectivement. Les amorces pour TH (5'-TGTCACGTCCCCAAGGTTTCAT-3' and 5'-GGGCAGGCCGGGTCTCTAAGT-3') ont été conçues par « BLAST sequence » avec le logiciel PRIMER3. Le protocole d'amplification standardisé consiste en une dénaturation initiale à 94 °C pour 5 minutes, suivi de 25 et 31 cycles pour TH et DAT respectivement. Chacun des cycles comprend une dénaturation à 94 °C pour 2 min, une hybridation à 52 °C pour 2 min et une extension à 70 °C pour 3 min. Suite à la série de cycles, il y a une extension finale de 7min à 70 °C. Pour le ER-β, le protocole consiste en une dénaturation initiale à 94 °C pour 5 minutes, suivi de 35 cycles à 94 °C pour 1.30 min, 52 °C pour 1.30 min et 70 °C pour 2 min, avec une extension finale de 7min à 70 °C. L'Amplification a été effectuée dans un appareil « Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler ». Pour s'assurer que la quantification a eu lieu dans la phase exponentielle, chaque cible a été

amplifiée pendant une série de cycles. Le nombre final de cycles était choisi au moment où le produit de l'amplification s'accumulait de façon logarithmique, c'est-à-dire que le système était dans la phase exponentielle, comme décrit précédemment [99]. Dix microlitres du produit de la réaction de PCR étaient analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1.5 % dans du tampon de migration TEA (40mM Tris-acétate, 1mM EDTA à un pH de 8.0) et coloré au « SYBR Safe DNA gel stain ». Les photos étaient prises à l'aide d'un appareil AlphaEase FC imaging system (AlphaInnotech, San Leandro, CA) et analysées avec le logiciel « AlphaEase » fourni avec l'appareil. Chaque analyse a été corrélée avec l'amplicon de la sous unité ribosomale 18S (5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' et 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3') comme contrôle interne.

2.5 Immunobuvardage de type « western »

Les protéines totales ont été extraites à l'aide du « Active Motif, Nuclear Extraction Kit » et elles ont été diluées dans 50 µl de la solution de lyse. Les protéines totales ont ensuite été dosées par le « BCA Protein Assay Kit, de Pierce ». La même quantité de protéines (15 µg pour toutes les expériences sauf pour les expériences avec TH où la concentration en protéines utilisée était de 1 µg) a été ajoutée dans un gel SDS-PAGE à 10 % en polyacrylamide. Suite à une électrophorèse de 45 min à 180 volts, les protéines ont été transférées, à 60 volts pour 2h, sur une membrane de nylon de type PVDF (Bio-Rad, avec des pores de 0.22 µm). Par la suite, les membranes ont été incubées dans 5% de lait en poudre écrémé pour 1h à température pièce (TP) afin d'éviter les liaisons non spécifiques. L'anticorps primaire dilué dans du TBS-T «Tris-Buffered Saline Tween-20 » a ensuite été ajouté sur la membrane. L'anticorps anti-TH (Sigma) a été utilisé à une concentration de 1 :2000 pour 2h à TP alors que pour le ER β (Calbiochem) la concentration était de 1 :250 pour une nuit à TP. Suite à quoi, un anticorps secondaire couplé à une peroxydase a été ajouté pour 1h à TP, à une concentration de 1 :10 000. La visualisation des résultats a été faite par chemiluminescence et l'acquisition des images a été faite à l'aide de l'appareil

« AlphaEase FC imaging system de AlphaInnotech » et les images ont été analysées avec le logiciel « AlphaEase » fourni avec l'appareil.

2.6 Immunofluorescence

Les PC12 traitées, ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 4 % pour 1 h à 4 °C. Ensuite, la perméabilisation des cellules se faisait avec du tampon gélatine de peau de poisson, qui contient sodium azide (0,02 %), Triton-X (0,1 %), gélatine de peau de poisson (0,18 %), albumine de sérum bovin (1 %), dilué dans du tampon tris (TBS). La séquence des étapes de détection était la suivante : les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires monoclonal anti-ER- α et polyclonal anti ER- β (1 :500, 2h à TP), ensuite elles ont été lavées avec du tampon phosphate (PBS) et l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente, CY3 ou Alexa, a été ajouté (1 :500, 2h à TP). Le 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) a été utilisé pour colorer tous les noyaux des cellules. Finalement, les lamelles de verre étaient montées sur une lame à l'aide du « Prolong Antifade Kit ». Les images ont ensuite été observées avec un microscope à fluorescence Orthoplan (Leitz) avec une lampe au mercure et les filtres cubes nécessaires. Les photos ont été prises à l'aide d'une caméra Qimaging (Nikon). Une analyse de l'intensité relative de la fluorescence en fonction de la surface a été effectuée avec le logiciel NIS-Element BR 2.10.

2.7 Dosage de la DA

Les cellules contenues dans deux puits d'une plaque de 6 puits ont été récupérées puis centrifugées 5 min à 3200 rpm. Le culot de cellules a ensuite été solubilisé dans 50 μ l d'acide chlorhydrique 0,05 N. L'acide a pour fonction de stabiliser la DA et le faible pH arrête la dégradation enzymatique. Ensuite, les cellules ont été lysées par 3 cycles de gel et dégel (-80 °C pour 2h, 37 °C pour 1h) [100]. Le lysat complet a ensuite

été utilisé dans la trousse de dosage de la DA [101]. Le dosage de la DA a été fait en deux étapes, la première étant l'extraction et l'acylation de la DA et la deuxième correspond à l'étape de l'ÉLISA. Brièvement, la DA a été extraite de l'échantillon à l'aide d'un gel d'affinité cis-diols spécifique, puis la DA a été acylée en N-acyldopamine. Suite à quoi, l'échantillon était prêt pour l'étape de l'ÉLISA. Le dosage de la DA fonctionne selon un principe de compétition. En effet, les catécholamines acylées de l'échantillon ont d'abord été transformées de façon enzymatique en dérivés O-méthylés et ces derniers sont ensuite entrés en compétition avec la DA liée à la phase solide, pour un nombre fixe de sites de liaisons à l'antisérum. Quand le système était à l'équilibre, les antigènes libres et liés à l'antisérum ont été éliminés par des lavages. On a ensuite détecté les anticorps liés aux méthanéphrines liés à la phase solide par un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. Suite à l'ajout du substrat de cette enzyme, le TMB (tétraméthylbenzidine), la réaction a pu être suivie à l'aide d'un lecteur de microplaque (Thermolab System, Franklin, MA) à 450 nm et la quantité d'anticorps liée à la phase solide est inversement proportionnelle à la concentration en DA de l'échantillon. La figure suivante illustre bien les différentes étapes de ce dosage.

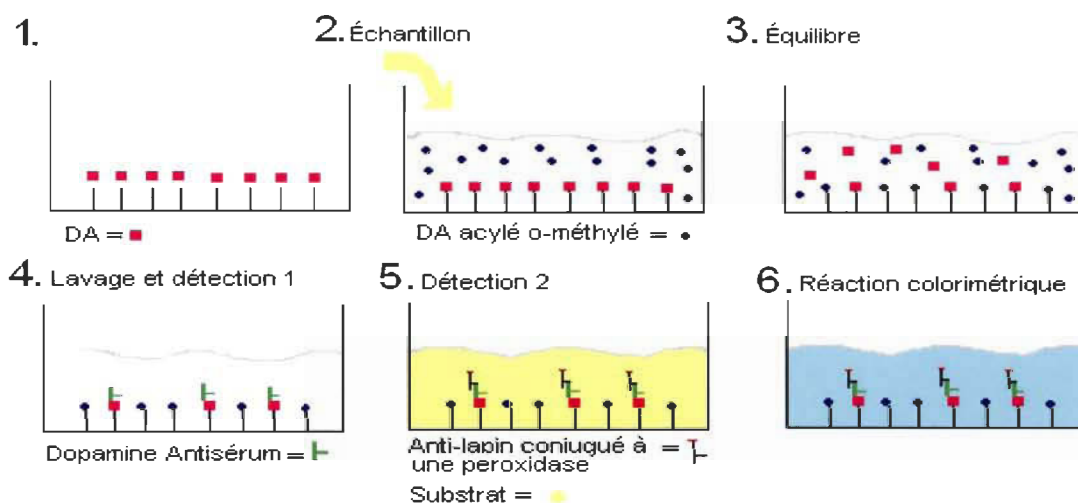


FIGURE 2.5 : Schéma explicatif du dosage de la DA

2.8 Quantification de l'activité de la SOD

Les cellules contenues dans deux puits de plaques de 6 puits ont été récupérées puis centrifugées 5 min à 3 500 rpm à une température de 4 °C. Le culot de cellules a ensuite été homogénéisé dans 1 ml de tampon HEPES (1mM EGTA, 210 mM mannitol et 70 mM sucrose) froid pH 7,2 et soniqué (3 fois, 5 sec) [102, 103]. L'échantillon a été centrifugé à 3 000 rpm à une température de 4 °C pour 5 min et le surnageant a été utilisé directement dans le kit de dosage de la SOD de Cayman chemical (Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)[102]. Cette trousse utilise le sel de tetrazolium pour détecter la production du $O_2^{\bullet-}$ qui est généré par la xanthine oxydase. S'il y a de la SOD dans l'échantillon, le $O_2^{\bullet-}$ sera dismuté par la SOD et la concentration en $O_2^{\bullet-}$ sera ainsi diminuée, ce qui aura pour effet de diminuer le signal colorimétrique. Une unité de SOD a été définie comme la quantité d'enzymes nécessaires pour dismuter 50% des radicaux superoxydes. Cette réaction colorimétrique a été suivie à l'aide d'un lecteur de microplaque (Thermolab System, Franklin, MA) à 450 nm.

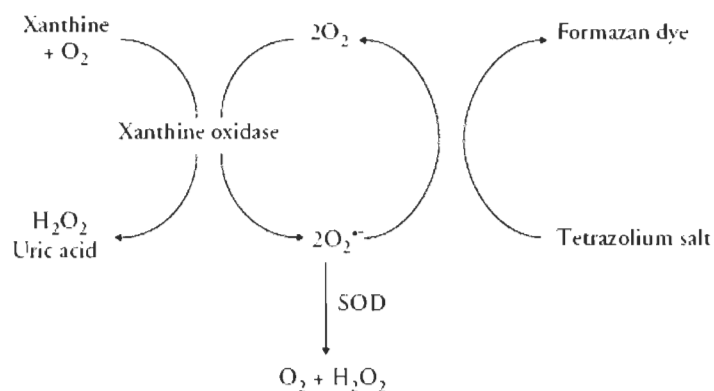


FIGURE 2.6: Schéma représentatif de la réaction enzymatique permettant le dosage de l'activité de la SOD [102].

2.9 Analyses statistiques

Les différences statistiques entre les différents groupes ont été déterminées par l'analyse de la variance (ANOVA), suivie d'un post test de type Tukey avec le logiciel « GraphPad InStat program », version 3.06. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm S.E.M. à partir de trois expérimentations différentes. Les étoiles indiquent une différence statistique par rapport à la condition contrôle et les cercles indiquent une différence statistique par rapport à la condition MPP+. *** (ou **ooo**) $p < 0.001$, ** (ou **oo**) $p < 0.01$, * (ou **o**) $p < 0.05$

CHAPITRE III

ARTICLE

3.1 Ma contribution au travail de recherche ainsi que celle des coauteurs de l'article

Durant mes études de maîtrise, j'ai fait les recherches, les manipulations et les mises au point du volet neuroprotection et de la majeure partie de volet caractère antioxydant de la sésamine présenté dans l'article : « Neuroprotective, anti-oxidative and anti-inflammatory role of sesamin in dopaminergic cells under MPP⁺-induced oxidative stress ». Ainsi, je suis responsable des résultats décrits dans les figures 1, 2 A et 2 B, 3 A, 5 A, 6 A, 6 B, 6 C et 6 D. Mes collègues de laboratoires ont aussi contribué à l'article de la façon suivante :

Julie Bournival : résultats décrits dans les figures 3 B, 4 B, 5 B, 7

Marilyn Plouffe : résultat décrits dans les figures 8

Julie Carange : résultat décrits dans les figures 4 A

3.2 Neuroprotective, anti-oxidative and anti-inflammatory role of sesamin in dopaminergic cells under MPP⁺-induced oxidative stress

Vicky Lahaie-Collins¹, Julie Bournival¹, Marilyn Plouffe¹, Julie Carange¹ and Maria-Grazia Martinoli^{1,2}

¹Department of Biochemistry and the Neuroscience Research Group, Université du Québec, Trois-Rivières, Québec, Canada

²Neuroscience Research Unit, Université Laval, Québec, Canada

Corresponding author:

Maria-Grazia Martinoli, Ph.D.
Department of Biochemistry
Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR)
3351, boul. des Forges, C.P. 500
Trois-Rivières, QC, Canada G9A 5H7
Tel: 819-376-5011 ext. 3994
Fax: 819-376-5241
E-mail: martinol@uqtr.ca

Key words: neuroprotection, oxidative stress, sesamin, lignans, MPP⁺, neurodegeneration, Parkinson's disease, neuroinflammation, dopamine, protein expression

Abbreviations:

CAT: catalase

Ct : mean cycle threshold values

DA: dopamine

DAergic: dopaminergic

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DAT: dopamine transporter

DHR: dihydrorhodamine 123

DMEM-F12: Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 ham

DMSO: dimethylsulfoxide

ER α : estrogen receptor-alpha

ER β : estrogen receptor-beta

FBS: fetal bovine serum

HS: horse serum

IL-6: interleukin-6

iNOS: inducible nitric oxide synthase

LDH: lactate dehydrogenase

LPS: lipopolysaccharide

MPP⁺: 1-methyl-4-phenyl-pyridine ion

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine

NGF: nerve growth factor

NO: nitric oxide

PD: Parkinson's disease

ROS: reactive oxygen species

RT: room temperature

RT-qPCR: Real time-quantitative polymerase chain reaction

SOD: superoxide dismutase

TH: tyrosine hydroxylase

TNF- β : tumor necrosis factor-beta

Running title: **Neuroprotective effects of sesamin**

Abstract

Oxidative stress is regarded as a mediator of nerve cell death in several neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease. Sesamin, a lignan mainly found in sesame oil, is currently under study for its anti-oxidative and possible neuroprotective properties. We used 1-methyl-4-phenyl-pyridine (MPP⁺) ion, the active metabolite of the potent parkinsonism-causing toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine, to produce oxidative stress and neurodegeneration in neuronal PC12 cells, which express dopamine, as well as neurofilaments. Our results show that picomolar doses of sesamin protected neuronal PC12 cells from MPP⁺-induced cellular death, as revealed by colorimetric measurements and production of reactive oxygen species. We also demonstrated that sesamin acted by rescuing tyrosine hydroxylase levels from MPP⁺-induced depletion. Sesamin, however, did not modulate dopamine transporter levels, and estrogen receptor-alpha and -beta protein expression. By examining several parameters of cell distress, we found that sesamin also elicited a strong increase in superoxide dismutase activity as well as protein expression and decreased catalase activity and the MPP⁺ stimulated inducible nitric oxide synthase protein expression, in neuronal PC12 cells. Finally, sesamin possessed significant anti-inflammatory properties, as disclosed by its potential to reduce MPP⁺-induced interleukin-6 mRNA levels in microglia. From these studies, we determined the importance of the lignan sesamin as a neuroprotective molecule and its possible role in complementary and/or preventive therapies of neurodegenerative diseases.

Introduction

A large body of experimental evidence supports a role for oxidative stress as mediator of nerve cell death in several neurodegenerative disorders, such as Parkinson disease (PD). The degeneration of dopaminergic (DAergic) neurons located in the *substantia nigra* characterizes PD and leads to a decline of dopamine (DA) as well as its biosynthetic enzyme, tyrosine hydroxylase (TH), and its high-affinity cellular transporter (DAT). As reported recently, apoptotic death of DA neurons may be initiated by oxidative stress and neuroinflammation [1-3]. Besides, elevated iron levels, decreased glutathione levels, impaired mitochondrial complex I activity and increased superoxide

dismutase (SOD) activity have been observed in PD brains [4-6].

1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) is a neurotoxin that causes Parkinson-like symptoms in humans, monkeys and mice.[7-9] This toxin is largely employed as an experimental model to study therapeutic strategies against PD. 1-Methyl-4-phenyl-pyridine ion (MPP^+), the active metabolite of MPTP, is selectively taken up in DAergic neurons by DAT and actively transported into the mitochondria where it interferes with the respiratory chain and inhibits complex 1, inducing energy depletion and producing reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anions [10,11]. Superoxide anions can react with nitric oxide (NO) to produce the potent oxidant peroxynitrite, which has been implicated in the development of many neurological diseases [1,12,13]. To date, however, the precise mechanism of MPP^+ -induced ROS generation is still under discussion [13].

On the other side, sesamin, a phytonutrient of the class of lignans, is a lipophilic compound found in sesame seeds and sesame seed oil and is known for its antioxidant role [14-16]. Sesamin as well as sesamol and sesaminol, the other 2 primary compounds in sesame, are likely responsible for the increased stability of sesame oil against auto-oxidation and the development of rancidity caused by free radicals [17]. Indeed, sesamin is recognized to have several positive physiological effects, such as hypocholesterolemic,[18] antihypertensive actions,[19] and regulates lipid and alcohol metabolism in the liver.[20] It is also known to protect against rotenone-induced loss of DA cells in mice[21] and to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-mediated activation of microglial cells *in vitro* [22].

In this study, we investigated the neuroprotective, antioxidative and anti-inflammatory actions of sesamin in a model of DA neurons, neuronal PC12 cells [23,24]. MPP^+ was used to induce oxidative damage in these cells and stimulate pro-inflammatory cytokine production in the microglial cells line N9 [25,26]. Our results show that picomolar doses of sesamin protect neuronal PC12 cells from oxidative stress by reducing MPP^+ -evoked cellular death and by decreasing ROS production. Moreover, sesamin restores TH protein expression after MPP^+ -induced reduction without modulating DAT protein levels. Our data also reveal that sesamin increases SOD activity and SOD protein production as well as diminishes catalase (CAT) activity, indicating a rescue role for

sesamin in the oxidative metabolism of DA neurons. Finally, our study demonstrates that sesamin decreases inducible NO synthase (iNOS) protein expression in neuronal cells and lowers mRNA levels of the potent pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) in microglial cells. In this comprehensive study, we outline the importance of the lignan sesamin as a neuroprotective molecule and its possible potential in complementary and/or preventive therapies of neurodegenerative diseases.

Materials and methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO) unless noted otherwise.

Cell culture and treatments

PC12 cells (ATCC, Rockville, MD) were maintained in a controlled environment at 37°C and in 5% CO₂ atmosphere. They were grown in RPMI-1640 medium, without phenol red, supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum (HS, Invitrogen, Toronto, ON, Canada) and gentamicin (50 µg/ml). The culture medium was changed every 3 days. For each experiment, cellular density was 30,000 cells/cm². Neuronal differentiation was induced for 8 days by 50 ng/ml nerve growth factor (NGF) in RPMI-1640 medium supplemented with 1% FBS, as already described [23]. To examine the effect of sesamin on MPP⁺-evoked oxidative stress, the cells were pretreated with sesamin (1 pM) for 3 h and then exposed to MPP⁺ (5 mM) for 24 h [23]. This concentration of sesamin was chosen as the lowest dose able to rescue cells from MPP⁺-induced cellular death, after kinetic and dose-response studies (data not shown). The microglial cell line N9 (a generous gift from Dr. L. Vallières, Centre de recherche, CHUL, Quebec, QC, Canada) was grown in 10% HS in Dulbecco's modified Eagle's medium-F12-ham (DMEM-F12). To assess the influence of sesamin on MPP⁺-induced N9 inflammation, the cells were pretreated with sesamin for 3 h and then exposed to MPP⁺ (500 µM) for 24 h. All experiments were performed in phenol red-free medium and charcoal-stripped serum to remove steroids from the medium.

Cytotoxicity measurements

Cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells into the supernatant, as already described [23]. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released into the cell culture supernatant upon damage of the plasma membrane. The amount of enzyme activity detected in the culture supernatant correlates with the portion of lysed cells [27,28].

Briefly, 100 μ l of cell-free supernatant were taken to quantify LDH activity by measuring absorbance at a wavelength of 490 nm on a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA). Total cellular LDH was determined by lysing the cells with 1% Triton X-100 (high control); the assay medium served as a low control and was subtracted from all absorbance measurements:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{Experimental value} - \text{Low control})}{(\text{High control} - \text{Low control})} \times 100\%$$

Dihydrorhodamine 123 (DHR) detection

The scavenging effect of sesamin against MPP⁺-induced oxidative stress was evaluated by DHR assay, as described previously [29,30]. In brief, a stock solution of DHR (Molecular Probes, Eugene, OR) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) to a concentration of 10 mM, deoxygenated with nitrogen and stored at -80°C. Neuronal PC12 cells were treated with DMSO (Ctrl), sesamin and/or MPP⁺. Then, they were quickly washed with PBS 0.1 M and exposed to 250 μ l of DHR at 37°C for 20 min. The slides were immediately examined under an Orthoplan fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany), photographed with a Qimaging camera (Nikon, Mississauga, ON, Canada) and analyzed by NIS-Element 2.2 software (Nikon).

Detection of SOD and CAT activity

Neuronal cells were mechanically harvested and then collected by centrifugation at 2,000g for 10 min at 4°C. The pellets were homogenized in 1 ml of cold 20 mM HEPES buffer, pH 7.2 (1 mM EGTA, 210 mM mannitol and 70 mM sucrose) and sonicated (3 times, 5 s). The samples were then centrifuged at 1,500g for 5 min at 4°C, and the supernatant was assayed according to the manufacturer's protocol (Superoxide Dismutase Assay Kit or Catalase Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of superoxide radicals. The reaction was monitored at 450 nm with a microplate reader (Thermolab System).

Electrophoresis and immunoblot analysis

NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 6-well plates. Total cellular proteins were extracted with Nuclear Extraction Kit (Active Motif, Carlsbad, CA), diluted in 50 μ l of lysis solution, and their concentration determined with a BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Equal amounts of protein (1 μ g) were loaded onto 10% polyacrylamide gel-sodium dodecyl sulfate. After electrophoretic separation (180 volts, 45 min), the polyacrylamide gels were transferred onto nylon PVDF membranes (0.22- μ m pore size, BioRad, Hercules, CA) at 60 V for 2 h. The membranes were blocked with 5% non-fat powder milk for 1 h at room temperature (RT). Immunoblotting was performed overnight at 4°C with anti-TH antibody (1:2,000) (Sigma), anti-DAT antibody (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Cu/Zn SOD antibody (1:1000) (StressMarq, Victoria, BC, Canada.), anti-CAT antibody (1: 50) (Santa Cruz Biotechnology), and anti-iNOS antibody (1:50) (StressGene, Biotech, Ann Arbor, MI). The following day, the membranes were washed, and anti-mouse POD-conjugated secondary antibody diluted 1:10,000 was added for 1 h at RT. Immunopositive signals were visualized by enhanced chemiluminescence with the AlphaEase FC imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and analyzed with AlphaEase FC software (Alpha Innotech).

Immunofluorescence

Neuronal PC12 cells were plated on collagen-coated coverslips in 24-well plates and neuronal differentiation was induced for 8 days with NGF, as described above. After treatment, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at 4°C, then permeabilized with fish skin gelatin buffer + Triton (TBS, 1% BSA, 0.18% fish skin gelatin, 0.1% Triton-X, 0.02% sodium azide) for 30 min at RT. The fixed cells were incubated with monoclonal anti-estrogen receptor-alpha (ER α) antibody (StressGene) diluted 1:500, for 2 h at RT or with polyclonal anti-ER- β antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:50, for 2 h at RT. Then, the slides were washed with PBS and stained with Cy3-conjugated secondary antibody (Medicorp, Montreal, QC, Canada) diluted 1:500, for 2 h at RT. Finally, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 5 μ g/ml)

was added for 10 min at 37°C to counterstain all nuclei. Coverslips were mounted with a Molecular Probes Prolong Antifade Kit (Invitrogen). Images were acquired with an Orthoplan fluorescence microscope (Leica) with a high-pressure mercury burner and necessary filter cubes, then analyzed with NIS-Element 2.2 software (Nikon).

Real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted with Sigma's GenElute Mammalian Total RNA extraction kit. RNA was spectrophotometrically measured for each condition, and 1 µg of total RNA was reverse-transcribed with 25 U of M-MULV reverse transcriptase, 1.5 µM dNTP, and 10 µM of random hexamers. RT-qPCR was then performed in a MiniOpticon Real-time PCR system (BioRad) in 20 µl-sized reactions containing 4 µl of the cDNA mixture, 0.3 µM of each forward and reverse primer and 10 µl of iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Incubation at 95°C for 3 min was followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 61°C. Primers for tumor necrosis factor-beta (TNF-β) (5'-CACGAGGTCCAGCTCTTTTC-3' and 5'-AGTGCAAAGGCTCCAAAGAA-3'), IL-6 (5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' and 5'-ATTTCCACGATTTCCCAGAG-3'), Ubiquitin C (5'-AGCCCAGTGTTACCAACCAAG-3' and 5'-TCACACCCAAGAACAAGCAC-3'), β-microglobulin (5'-ATGGGAAGCCGAACATACTG-3' and 5'-CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT-3') were synthesized at Sigma Genosys (Oakville, ON, Canada). Reactions were performed in duplicate, and 3 independent preparations of cDNA were studied. A 10-fold dilution series was obtained from a random pool of cDNA ranging from x10 to x100,000 dilution. Mean cycle threshold values (Ct) for each dilution were plotted against log10 of cDNA input to generate efficiency plots. The reaction efficiency for each gene assay was calculated according to the following equation: $E=10(-1/\text{slope})$ where E was the reaction efficiency, and 'slope' was the slope of the line generated in efficiency plots. All PCR efficiencies were above 90%. In all PCR experiments, post-PCR DNA-melting curve analysis was undertaken to assess amplification specificity. DNA-melting was carried out at a temperature ramping rate of 1°C per step with 1-s rest at each step. Relative gene transcription was calculated by the comparative Ct method, using the real-time efficiency values of each gene. cDNA levels among the samples were normalized

by the expression level of 2 internal control genes: ubiquitin and β -microglobulin. These housekeeping genes were chosen with the GeNORM algorithm [31]. A normalization factor was calculated with the geometric mean of the 2 reference genes. The normalized expression of each gene of interest was calculated by dividing the raw quantities for each sample by the appropriate normalization factor [31].

Statistical analysis

Significant differences between treatment effects were determined by 1-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test and Student-Newman-Keuls analysis with the GraphPad Instat program, version 3.06, for Windows© (San Diego, CA, www.graphpad.com). Data are expressed as the means \pm S.E.M. from 3 to 15 independent experiments. Asterisks (*) indicate statistical differences between the treatment and respective control conditions, and circles ($^{\circ}$) show statistical differences between the treatment and MPP⁺ conditions.

Results

Sesamin reduces MPP⁺-induced cytotoxicity and MPP⁺ production of ROS

We measured the protective effect of pretreatment with 1 pM sesamin on MPP⁺-induced neuronal death. Figure 1 shows significant cell death after 24-h exposure to MPP⁺. Pretreatment with 10⁻¹² M sesamin prior to the production of oxidative stress greatly attenuated MPP⁺ toxicity in neuronal PC12 cells. Specifically, sesamin protected neuronal PC12 cells against MPP⁺ by reducing MPP⁺-evoked cellular death by 60%. Figure 2 illustrates the rhodamine detection of ROS in neuronal PC12 cells. The non-fluorescent dye DHR was converted to rhodamine in the presence of ROS [29,32,33]. Figure 2A shows low levels of rhodamine fluorescence in control neuronal PC12 cells as well as in cells treated with sesamin alone, after 24 h (Fig. 2A, CTRL and sesamin, respectively), whereas a marked signal was detected in MPP⁺-treated neuronal cells (Fig. 2A, MPP⁺). On the other hand, cells treated with sesamin prior to MPP⁺ demonstrated a dampened signal in comparison to MPP⁺ alone (Fig. 2A, sesamin+MPP⁺), suggesting a scavenging action of sesamin on MPP⁺-induced oxidative stress. Figure 2B reports on the semi-quantitative analysis of rhodamine fluorescence presented in figure 2A, revealing high-level fluorescence in the presence of MPP⁺ and a very significant reduction ($p < 0.001$) when the neuronal cells were pretreated with sesamin prior to MPP⁺.

Effect of sesamin on MPP⁺-induced increase in SOD and CAT activity

We used tetrazolium salt to detect superoxide radicals, as described in *Materials and methods*. If SOD was present in the sample, the superoxide radicals would be dismutated by the enzyme. Figure 3 illustrates that sesamin alone increased SOD activity (Fig. 3A). Interestingly, sesamin also heightened SOD protein expression (Fig. 3B) in the same experimental paradigm, as revealed by Western blot analysis, indicating a shielding role for sesamin in pretreatment experiments. Our results also show that MPP⁺ increased both SOD and CAT activities, confirming a cellular response to MPP⁺ production of ROS (Fig. 2), as demonstrated *in vivo* [34]. When sesamin was administered prior to MPP⁺, we still detected an increment of SOD activity compared to

the control condition (Fig. 3A). However, we did not observe any statistically-significant difference in SOD activity compared to MPP⁺ levels. Figure 4A reveals that sesamin alone decreased CAT activity and Fig 4B shows no apparent modulation of CAT protein expression. More importantly, sesamin reduced the MPP⁺-induced increase in CAT activity (Fig. 4A) when administered prior to MPP⁺, supporting an anti-oxidant role for sesamin in MPP⁺-treated cellular systems.

Sesamin rescues TH protein expression without modulating DAT protein level

TH is the rate-limiting enzyme for DA production. TH protein expression was decreased after treatment with MPP⁺, whereas sesamin alone did not modulate it (Fig. 5A). Interestingly, when the cells were co-treated with MPP⁺ and sesamin, a slight but constant increase in TH protein expression was manifested, suggesting a neuroprotective role for sesamin in DA neurons. Figure 5B depicts that DAT protein levels were downregulated by MPP⁺, as already reported,[23,24] and they were not impacted by sesamin alone. Pretreatment with sesamin before MPP⁺ caused a slight decline in DAT protein levels which was not statistically significant in comparison to MPP⁺ values.

Sesamin does not modulate ER α or ER β protein expression

MPP⁺ administration did not influence ER α or ER β protein expression in neuronal PC12 cells, as already demonstrated [23,24]. Sesamin, alone or in combination with MPP⁺, also did not alter ER α or ER β protein expression (Fig. 6A, B and 6C, D, respectively), indicating that the intracellular actions of sesamin do not involve the nuclear ERs. Interestingly, immunofluorescence also revealed the cytoplasmic and nuclear localization of ER α , whereas ER β appeared to be localized exclusively in the cytoplasm (Fig. 6B and 6D, respectively).

Sesamin modulates iNOS protein expression

Western blotting quantified the protein expression of iNOS, the enzyme mainly responsible for NO synthesis. Molecules that can inhibit iNOS may have anti-inflammatory activity. Figure 7 shows that when neuronal PC12 cells were exposed to MPP⁺, iNOS production was augmented as expected and already demonstrated [35]. In

Figure 7, we also report that sesamin alone reduced iNOS production and that its administration prior to MPP⁺ provoked a marked decrease of MPP⁺-induced iNOS production, sustaining a scavenging role of sesamin against reactive nitrogen species.

Sesamin diminishes MPP⁺-induced IL-6 mRNA in microglial cells

By RT-qPCR, we measured the expression of the potent pro-inflammatory cytokine IL-6. Figure 8 shows that MPP⁺ induced the activation of N9 microglial cells by dramatically increasing IL-6 mRNA levels. When sesamin was administered alone, no IL-6 was detectable, whereas the pretreatment of neuronal PC12 cells with sesamin 3 h before MPP⁺ elicited a reduced pattern of IL-6 gene expression, suggesting sesamin's significant anti-inflammatory role.

Discussion

A growing body of literature is reporting a positive association between the consumption of foods and beverages containing high levels of natural antioxidants and the prevention of several age-dependent diseases, such as cancer, stroke, osteoporosis and coronary heart disorders[36] as well as Alzheimer's disease,[37,38] opposite to the effects of high-calorie diets [39]. In this study, we tested neuronal PC12 cells, a known, reliable and efficient paradigm for the investigation of oxidative stress and neuroprotection of DA neurons [23,40]. After NGF administration, PC12 cells differentiate into the neuronal-like phenotype that secretes high DA levels and expresses TH, DAT, neurofilaments as well as ER α and ER β [23, 41-44]. It has already been demonstrated that various natural molecules exert anti-oxidative actions on mammalian cells, but these effects often require micromolar concentrations which would likely be impossible to sustain *in vivo* in humans due, in part, to the rapid metabolism of these phytonutrients [45-47]. In this study, we examined the neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory consequences of low doses of sesamin (10^{-12} M), the major component of sesame oil. The positive outcomes we reported in neuronal culture, using picomolar doses of sesamin on parameters of neuroprotection, oxidative metabolism and neuroinflammation, are supported by the fact that sesamin is likely to accumulate in serum and in the brain, being less susceptible to conjugation in the liver [48]. In particular, we demonstrated that picomolar doses of sesamin can protect DA neuronal cells from MPP $^{+}$ -induced cellular death by reducing intracellular ROS production. Indeed, non-fluorescent DHR has the capacity to enter cells and, once in, it is oxidized by oxygen species (superoxide anion, peroxynitrite) in fluorescent rhodamine [33]. Accordingly, our results show increased rhodamine fluorescence after MPP $^{+}$ treatment and reduced fluorescence when sesamin is administered to neuronal PC12 cells prior to MPP $^{+}$.

Currently, many clues point to the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of PD (for reviews see refs.[49,50]). On the one hand, it is now also recognized that estrogen replacement therapy in postmenopausal women reduces the risk of neurodegenerative diseases, particularly PD,[51] possibly because the antioxidant properties of estrogens contribute to their neuroprotective actions. Nevertheless, clinical

trials have raised growing concern about the secondary hormonal outcomes of hormone replacement therapy [52]. Yet, phytoestrogens are naturally-occurring molecules that may exert neuroprotective effects similar to those of estrogens [23,53,54] and have lesser hormonal actions. In our study, sesamin did not modulate ER α or ER β making it unlikely that these nuclear receptors are involved in its neuroprotective outcomes.

MPTP has been widely used as a DA neurotoxin because it causes a severe Parkinson-like syndrome in humans, monkeys and mice [7-9]. MPTP can produce oxidative stress in neurons by various mechanisms. ROS are generated during MPTP metabolism to MPDP and then to MPP⁺, by monoamino oxidase B in astrocytes. Moreover, massive DA release after MPP⁺/MPTP administration evokes excessive amounts of H₂O₂, resulting in oxidative stress. MPP⁺ can also elicit ROS release through the inhibition of mitochondrial respiration by impairing Na⁺/K⁺-ATPase function and leading to neuronal depolarization [11,55]. Then, the levels of TH protein, the DA key chain metabolic enzyme, are reduced *in vivo* after MPTP administration [56]. Our present findings demonstrated prevention of the MPP⁺-induced decline in TH expression when sesamin was administered prior to MPP⁺, indicating a neuroprotective action of sesamin in DA neurons. Besides, we did not detect any modulation of DAT protein levels by sesamin, yet a specific effect of sesamin on TH expression was sustained. This is significant since DAT exerts its critical function by transporting DA into presynaptic cells; thus, molecules or pathologies that disrupt DAT could have a profound impact on the behaviors and physiological conditions it mediates [57,58]. DAT is also known to be sensitive to inhibition by ROS and possibly by NOS [13]. Our results showing reduced DAT protein levels after MPP⁺ administration confirm previous data [24]. However, in our experiments, we could not demonstrate the recovery of DAT protein expression when sesamin was given prior to MPP⁺, indicating no acting defense of sesamin against MPP⁺-induced damage. Alternatively, the picomolar doses of sesamin we tested were not sufficient to specifically modulate DAT expression against the relatively high doses of MPP⁺ we used. These relatively high doses of MPP⁺ were required in our cellular paradigm as well as in others[59,60] to reach significant cellular death over a short time period.

We also analyzed the effects of sesamin on parameters of cell distress as well as markers of neuroinflammation. Indeed, increased iron levels, decreased glutathione levels, impaired mitochondrial complex 1 activity and heightened SOD activity have been observed in PD brains [4-6]. Moreover, the apoptotic death of DA neurons may be initiated by oxidative stress and neuroinflammation [2,3]. *In vivo* studies suggest that sesamin protects the liver against Fe-induced oxidative damage by decreasing liver enzyme activities involved in lipogenesis and by increasing those implicated in fatty acid oxidation [61,62]. Augmented SOD activity demonstrates that sesame lignans may enhance the ability to eliminate superoxide radicals formed during Fe^{2+} -induced oxidative stress [14]. Accordingly, we found increased SOD activity as well as SOD protein expression when sesamin was administered alone in the medium, indicating a protective role in pretreatment experiments. In addition, several other natural and synthetic molecules are reported to heighten SOD activity in various cellular systems [63-65]. MPP^+ also augmented SOD activity in our experiments, as described in the recent literature where MPTP increased SOD activity by generating superoxide ions [34]. In our experimental conditions, pretreatment with sesamin prior to MPP^+ administration elevated SOD activity in comparison to control cells, but this was similar to SOD activity after MPP^+ treatment. The apparent contrasting action of SOD should be analyzed by comparing it with the results obtained by fluorescent rhodamine. Indeed, low ROS levels, illustrated by low rhodamine fluorescence (sesamin alone and sesamin+ MPP^+), sustained the ability of sesamin to induce SOD activity and protein expression, as demonstrated by our data. When MPP^+ was administered, rhodamine fluorescence indicated high ROS levels and, consequently, the cells responded by augmenting SOD activity, as already reported [34]. Our findings clearly show that SOD activity may be induced by 2 different mechanisms, a protective mechanism and a response-to-stress mechanism. Pretreatment with sesamin prior to MPP^+ administration indicates low ROS levels, as revealed by rhodamine fluorescence, and suggests that the SOD activity induced by sesamin pretreatment may scavenge MPP^+ -generated ROS. However, other data are needed to determine the balance between sesamin- and MPP^+ -induced SOD activity.

CAT activity is another parameter of oxidative stress. Our results showed that sesamin decreased CAT activity and sesamin pretreatment reduced the MPP⁺-induced increase in CAT activity, confirming a scavenging role for sesamin in the pretreatment experimental condition.

To date, ROS can no longer be regarded as the sole damaging species in MPTP/MPP⁺-induced toxicity [13,66]. Certainly, NO is an apoptosis-inducer, and iNOS is a key enzyme in charge of producing large NO quantities. In this study, we demonstrated that sesamin markedly reduced the MPP⁺-induced upregulation of iNOS expression, corroborating other data on similar effects of curcumin in PC12 cells [67].

Finally, microglia activation and neuroinflammation have been proposed as candidates that mediate the apoptotic cell death of DA neurons. Currently, various phytonutrients, such as resveratrol, quercetin, silymarin, epigallocatechin-3-gallate and sesamin, have been found to dampen microglial activation *in vitro* and *in vivo* [68-71]. Others report that sesamin inhibits LPS-mediated activation of microglial cells *in vitro* [62,72] as well as iNOS mRNA levels [73]. MPTP has recently been reported to activate microglia *in vivo* [25,74] and to induce TNF α expression [75]. Pro-inflammatory cytokines, identified in the post-mortem *substantia nigra*, striatum, and cerebrospinal fluid of PD patients, include TNF α , IL-1 β , -2 and -6 and interferon- γ [76,77]. We studied the N9 microglial cell line to quantitatively analyze mRNA levels of the potent pro-inflammatory cytokine IL-6. Our results are the first to quantitatively indicate that sesamin can indeed reduce mRNA IL-6, when the inflammation process is induced by MPP⁺, supporting a complex role of sesamin in the mechanisms of neuroprotection, both at the neuronal and glial levels.

In conclusion, our comprehensive findings point to a distinct role of the sesame lignan sesamin as a potent neuroprotective antioxidant and anti-inflammatory agent. Certainly, cellular studies on natural compounds that could restore damaged mitochondrial functions and interfere with the production of ROS and NOS could benefit complementary alternative medicine and preventive therapies of neurodegenerative diseases.

Acknowledgments; This work was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council (Canada) grant to MGM and Fonds de Recherche en Santé du Québec (Québec) studentships to VLC and JB.

References

1. Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2000; 7:240-50.
2. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3:S26-36; discussion S-8.
3. Marchetti B, Abbracchio MP. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26:517-25.
4. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004; 10 Suppl:S18-25.
5. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 1997; 69:1196-203.
6. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002; 8:323-34.
7. Langston JW, Irwin I. MPTP: current concepts and controversies. *Clin Neuropharmacol* 1986; 9:485-507.
8. Heikkila RE, Sieber BA, Manzino L, Sonsalla PK. Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Mol Chem Neuropathol* 1989; 10:171-83.
9. Kopin IJ, Markey SP. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Ann Rev Neurosci* 1988; 11:81-96.
10. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004; 318:215-24.
11. Segura Aguilar J, Kostrzewa RM. Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotoxicity Res* 2004; 6:615-30.
12. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5:834-42.
13. Obata T. Nitric oxide and MPP⁺-induced hydroxyl radical generation. *J Neural Transm* 2006; 113:1131-44.

14. Hemalatha S, Raghunath M, Ghafoorunissa. Dietary sesame oils inhibit iron-induced oxidative stress in rats [corrected]. *Br J Nutr* 2004; 92:581-7.
15. Suja KP, Jayalekshmy A, Arumughan C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*sesamum indicum* L.) in DPPH(*) system. *J Agric Food Chem* 2004; 52:912-5.
16. Ghafoorunissa, Hemalatha S, Rao MV. Sesame lignans enhance antioxidant activity of vitamin E in lipid peroxidation systems. *Mol Cell Biochem* 2004; 262:195-202.
17. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992; 32:67-103.
18. Hirata F, Fujita K, Ishikura Y, Hosoda K, Ishikawa T, Nakamura H. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis* 1996; 122:135-6.
19. Noguchi T, Ikeda K, Sasaki Y, Yamamoto J, Seki J, Yamagata K, Nara Y, Hara H, Kakuta H, Yamori Y. Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2001; 24:735-42.
20. Kiso Y. Antioxidative roles of sesamin, a functional lignan in sesame seed, and its effect on lipid- and alcohol-metabolism in the liver: a DNA microarray study. *BioFactors* (Oxford, England) 2004; 21:191-6.
21. Fujikawa T, Kanada N, Shimada A, Ogata M, Suzuki I, Hayashi I, Nakashima K. Effect of sesamin in *Acanthopanax senticosus* HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:169-72.
22. Jeng KC, Hou RC, Wang JC, Ping LI. Sesamin inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production by suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *Immunol Lett* 2005; 97:101-6.
23. Gelinas S, Martinoli MG. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002; 70:90-6.
24. Gagne B, Gelinas S, Bureau G, Lagace B, Ramassamy C, Chiasson K, Valastro B, Martinoli MG. Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. *Endocrine* 2003; 21:89-95.
25. Miwa H, Kubo T, Morita S, Nakanishi I, Kondo T. Oxidative stress and microglial activation in substantia nigra following striatal MPP+. *Neuroreport* 2004; 15:1039-44.
26. Henze C, Hartmann A, Lescot T, Hirsch EC, Michel PP. Proliferation of microglial cells induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in mesencephalic cultures

results from an astrocyte-dependent mechanism: role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Neurochem* 2005; 95:1069-77.

27. Martin A, Clynes M. Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; 27A:183-4.

28. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 115:61-9.

29. Gelinas S, Bureau G, Valastro B, Massicotte G, Cicchetti F, Chiasson K, Gagne B, Blanchet J, Martinoli MG. Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotoxicity Res* 2004; 6:141-8.

30. Frantseva MV, Carlen PL, Perez Velazquez JL. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. *Free Radical Bio Med* 2001; 31:1216-27.

31. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 June 18.

32. Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 1993; 217:973-80.

33. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Bio Med* 1994; 16:149-56.

34. Thomas B, Saravanan KS, Mohanakumar KP. In vitro and in vivo evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole. *Neurochem Int* 2008; 52:990-1001.

35. Cheng YH, Ding ST, Chang MH. Effect of fumonisins on macrophage immune functions and gene expression of cytokines in broilers. *Arch Anim Nutr* 2006; 60:267-76.

36. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002; 177:91-104.

37. Anekonda TS. Resveratrol – a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 2006; 52:316-26.

38. Hartman RE, Shah A, Fagan AM, Schwetye KE, Parsadanian M, Schulman RN, Finn MB, Holtzman DM. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 24:506-15.
39. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444:337-42.
40. Chiasson K, Daoust B, Levesque D, Martinoli MG. Dopamine D2 agonists, bromocriptine and quinpirole, increase MPP+-induced toxicity in PC12 cells. *Neurotoxicity Res* 2006; 10:31-42.
41. Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N, Kadota K. Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 1996; 44:989-96.
42. Nilsen J, Mor G, Naftolin F. Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 1998; 5:211-6.
43. Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, Delapierre B, Gelinas S, Martinoli MG. Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently. *J Mol Neurosci* 2006; 30:297-310.
44. Lee V, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW. Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor. *Brain Res* 1982; 238:169-80.
45. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, Fogliano V, Marchelli R. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:495-504.
46. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann Rev Nutr* 2002; 22:19-34.
47. Umeda-Sawada R, Ogawa M, Igarashi O. The metabolism and distribution of sesame lignans (sesamin and episesamin) in rats. *Lipids* 1999; 34:633-7.
48. McCarty MF. Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 2006; 67:251-69.
49. Drechsel DA, Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biol Med* 2008; 44:1873-86.

50. Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2007; 6:411-23.
51. Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF. Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004; 61:886-8.
52. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-33.
53. Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* 2002; 23:719-35.
54. Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets* 2003; 2:95-107.
55. Mytilineou. Mechanism of MPTP neurotoxicity. In: *Mechanisms of Degeneration and Protection of the Dopaminergic System* (2001). Segura-Aguilar J. Ed. FP Graham Publications, Johnson City TN; 131-148.
56. Blanchet J, Longpre F, Bureau G, Morissette M, Dipaolo T, Bronchti G, Martinoli MG. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32:1243-50.
57. Mehler-Wex C, Riederer P, Gerlach M. Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurotoxicity Res* 2006; 10:167-79.
58. Salahpour A, Ramsey AJ, Medvedev IO, Kile B, Sotnikova TD, Holmstrand E, Ghisi V, Nicholls PJ, Wong L, Murphy K, Sesack SR, Wightman RM, Gainetdinov RR, Caron MG. Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:4405-10.
59. Itano Y, Kitamura Y, Nomura Y. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced cell death in PC12 cells: inhibitory effects of several drugs. *Neurochem Int* 1994; 25:419-24.
60. Fall CP, Bennett JP, Jr. Characterization and time course of MPP⁺-induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 1999; 55:620-8.

61. Sirato-Yasumoto S, Katsuta M, Okuyama Y, Takahashi Y, Ide T. Effect of sesame seeds rich in sesamin and sesamol on fatty acid oxidation in rat liver. *J Agr Food Chem* 2001; 49:2647-51.
62. Kushiro M, Takahashi Y, Ide T. Species differences in the physiological activity of dietary lignan (sesamin and episesamin) in affecting hepatic fatty acid metabolism. *Br J Nutr* 2004; 91:377-86.
63. An LJ, Guan S, Shi GF, Bao YM, Duan YL, Jiang B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem Toxicol* 2006; 44:436-43.
64. Hou RC, Wu CC, Yang CH, Jeng KC. Protective effects of sesamin and sesamol on murine BV-2 microglia cell line under hypoxia. *Neurosci Lett* 2004; 367:10-3.
65. Jung TW, Lee JY, Shim WS, Kang ES, Kim SK, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340:221-7.
66. Gonzalez-Polo RA, Soler G, Rodriguezmartin A, Moran JM, Fuentes JM. Protection against MPP⁺ neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants. *Cell Biol Int* 2004; 28:373-80.
67. Chen J, Tang XQ, Zhi JL, Cui Y, Yu HM, Tang EH, Sun SN, Feng JQ, Chen PX. Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. *Apoptosis* 2006; 11:943-53.
68. Bureau G, Longpre F, Martinoli MG. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res* 2008; 86:403-10.
69. Bi XL, Yang JY, Dong YX, Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:185-93.
70. Li R, Huang YG, Fang D, Le WD. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation and protects against inflammation-mediated dopaminergic neuronal injury. *J Neurosci Res* 2004; 78:723-31.
71. Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, Hong JS, Jeng KC. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur J Neurosci* 2002; 16:2103-12.
72. Hou RC, Huang HM, Tzen JT, Jeng KC. Protective effects of sesamin and sesamol on hypoxic neuronal and PC12 cells. *J Neurosci Res* 2003; 74:123-33.

73. Hou RC, Chen HL, Tzen JT, Jeng KC. Effect of sesame antioxidants on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. *Neuroreport* 2003; 14:1815-9.
74. Gao JP, Sun S, Li WW, Chen YP, Cai DF. Triptolide protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: implication for immunosuppressive therapy in Parkinson's disease. *Neurosci Bull* 2008; 24:133-42.
75. Gomez-Santos C, Francisco R, Gimenez-Xavier P, Ambrosio S. Dopamine induces TNFalpha and TNF-R1 expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroreport* 2007; 18:1725-8.
76. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 1999; 19:3440-7.
77. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1996; 211:13-6.

Figure Legends

Figure 1: Effect of sesamin on MPP⁺-induced toxicity, as revealed by measuring LDH activity in supernatants after 24 h of treatment. Neuronal cells were pretreated with 10⁻¹² M sesamin for 3 h, and then MPP⁺ was added for 24 h. The control medium was subtracted from all absorbance measurements, as described in *Materials and methods*. n=6. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 vs sesamin alone; ^{ooo}*p*<0.001 vs MPP⁺.

Figure 2: Rhodamine detection of ROS within neuronal PC12 cells. DHR is oxidized to fluorescent rhodamine in the presence of ROS. **A:** Fluorescence microphotographs, Ctrl: cells were treated with vehicle. Sesamin: cells were treated with 10⁻¹² M sesamin. MPP⁺: cells were treated with 5 mM. Sesamin+MPP⁺: cells were pretreated with sesamin for 3 h and then MPP⁺ was administered. A marked signal is evident only in neuronal PC12 cells treated with MPP⁺ but not in those treated with medium (CTRL) or sesamin alone. **B:** Semi-quantitative image analysis. Fluorescent units (F.U.). Magnification x 400. n=3. ****p*<0.001 vs CTRL or sesamin alone; ^{ooo}*p*<0.001 vs MPP⁺.

Figure 3: SOD activity (**A**) and SOD protein expression (**B**). **A:** Sesamin markedly increased SOD activity in our experimental conditions. MPP⁺ also up-regulated SOD activity by generating superoxide ions. SOD activity levels were increased over control values when sesamin was administered prior to MPP⁺. **B:** Western blots indicate increased SOD protein expression when sesamin was added to the medium in neuronal PC12 cells. ****p*<0.001 and **p*<0.05 vs CTRL; ^{oo}*p*<0.01 vs MPP⁺ ; MPP⁺ vs sesamin+MPP⁺ is non significant (NS)

Figure 4: CAT activity (**A**) and CAT protein expression (**B**). **A:** CAT activity was significantly reduced in the presence of sesamin whereas it was increased when MPP⁺ was administered. Treatment of neuronal PC12 cells with sesamin prior to MPP⁺ reduced MPP⁺-induced CAT activity levels. **B:** Western blots. ***p*<0.01 and vs CTRL; ^{oo}*p*<0.01 and ^{ooo}*p*<0.001 vs MPP⁺.

Figure 5: TH protein expression (**A**) and TH protein expression (**B**). **A:** Sesamin did not modulate TH expression when used alone in neuronal PC12 cells. When it was administered prior to MPP⁺, a slight but constant increase of TH protein expression was apparent. **B:** Western blots revealed that sesamin did not modulate DAT protein levels.

MPP⁺ decreased DAT levels. We could not detect any statistically-significant variation when the cells were pretreated with sesamin before MPP⁺ administration. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ vs CTRL; ° $p < 0.05$ vs MPP⁺; MPP⁺ vs sesamin+MPP⁺ is non significant (NS).

Figure 6: ERα (A, B) and ERβ (C, D) protein expression, as revealed by immunofluorescence in neuronal PC12 cells. No statistically-significant difference of ERα or ERβ protein expression was observed after each treatment. Microfluorescence panels (A, C): ERα and ERβ proteins as revealed by monoclonal antibodies (red staining with Cy3); nuclei were coloured blue with DAPI, as described in *Materials and methods*. Histograms (B, D): semi-quantitative analysis of the fluorescent signal shown above. CTRL, sesamin alone, MPP⁺, MPP⁺+sesamin in both panels. Magnification x 400.

Figure 7: iNOS protein expression as revealed in neuronal PC12 cells after sesamin and MPP⁺ administration. 10⁻¹² M sesamin slightly decreased iNOS protein expression and MPP⁺ markedly increased iNOS protein levels in our cellular paradigm. When sesamin was administered prior to MPP⁺ a significant decline of iNOS was detected. ** $p < 0.01$ vs CTRL; °°° $p < 0.001$ vs MPP⁺.

Figure 8: IL-6 mRNA levels shown by RT-qPCR. N9 microglia cells were first treated or not with sesamin for 3 h, then MPP⁺ was added or not. MPP⁺ clearly induced a significant increase of IL-6 mRNA levels, but when microglial cells were treated with sesamin prior to MPP⁺, we detected a significant decline of IL-6 mRNA.. n=3. *** $p < 0.001$ vs CTRL, °° $p < 0.01$ vs MPP⁺.

Figures

Figure 1

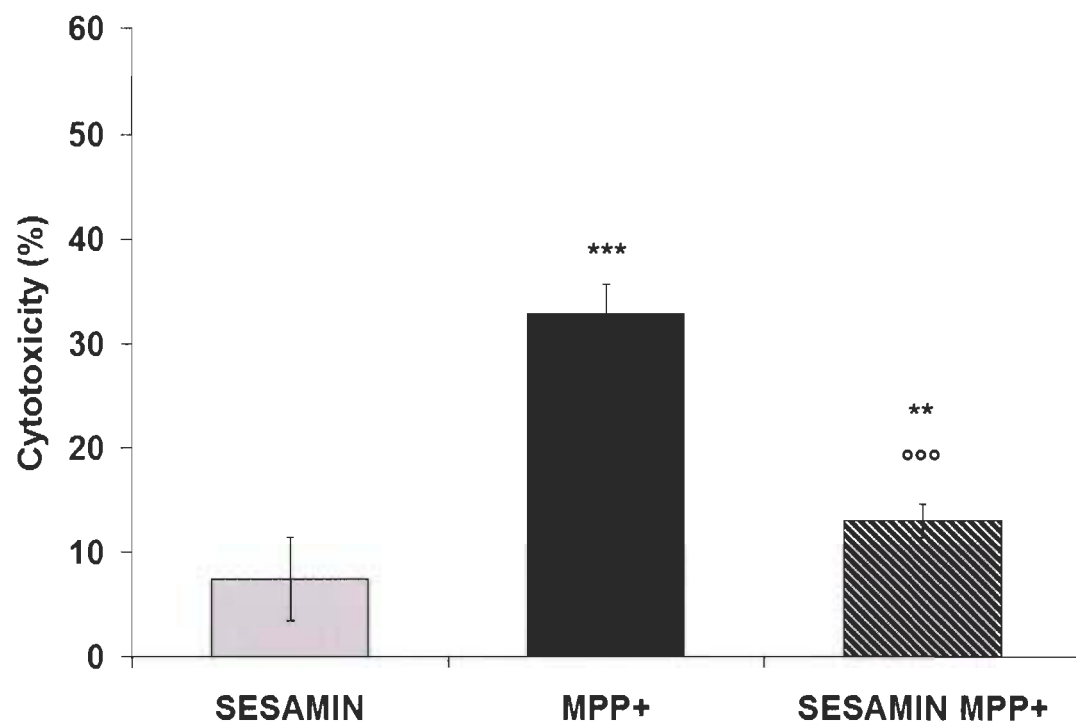


Figure 2

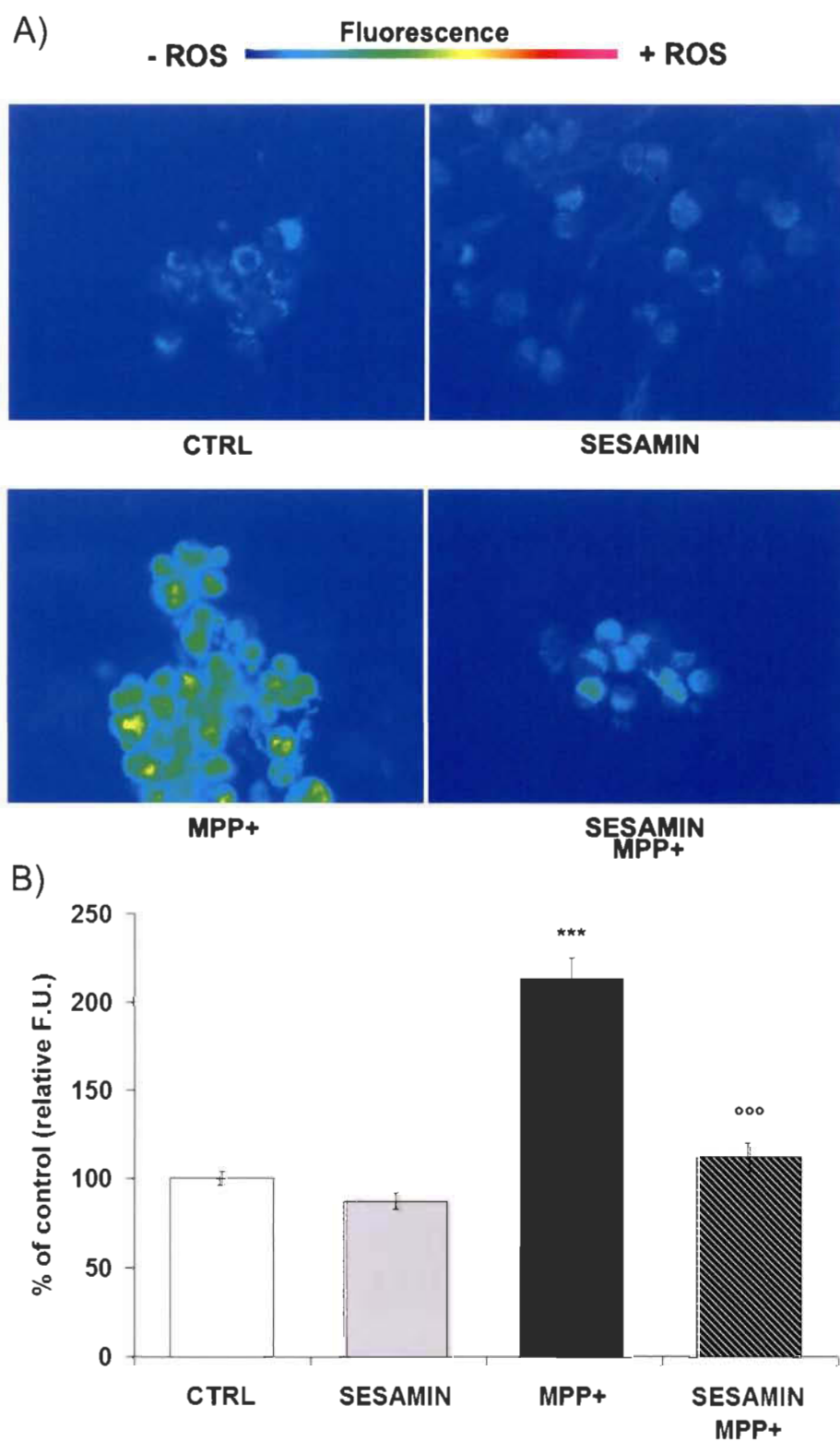


Figure 3

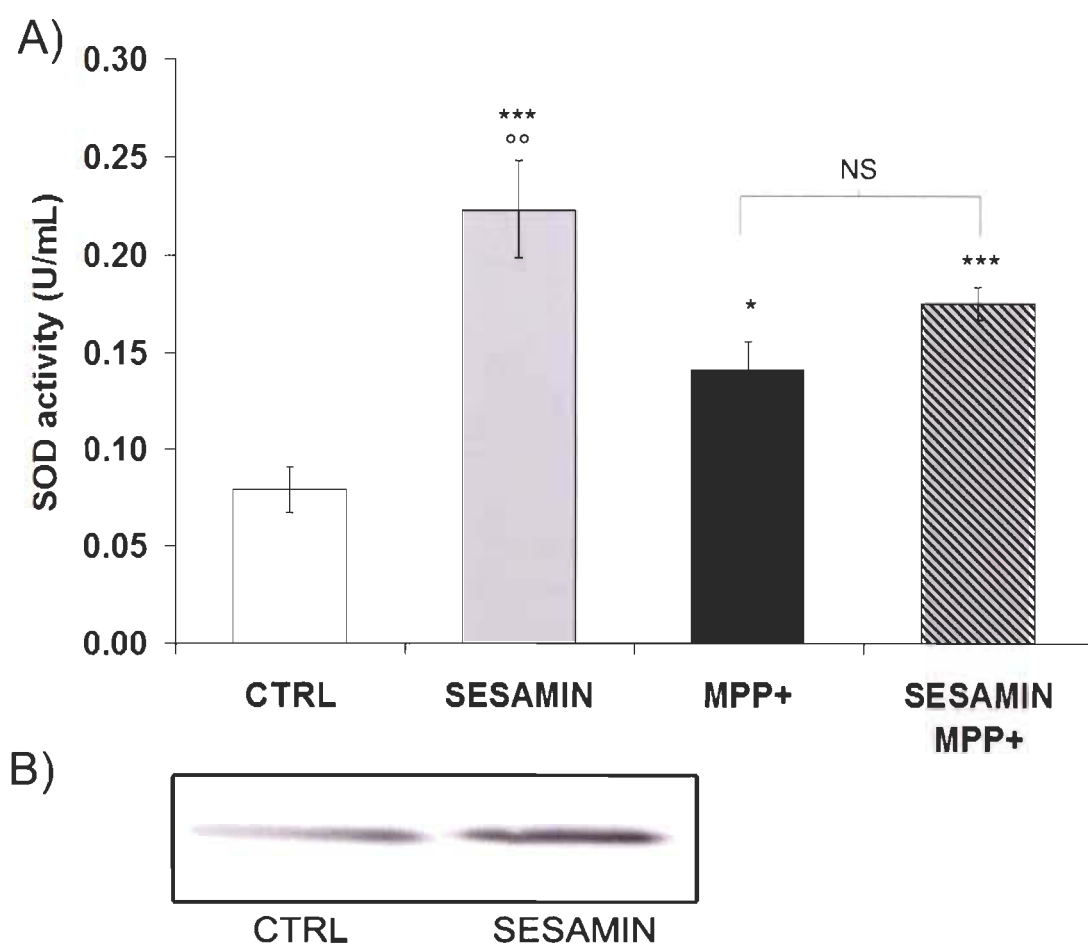


Figure 4

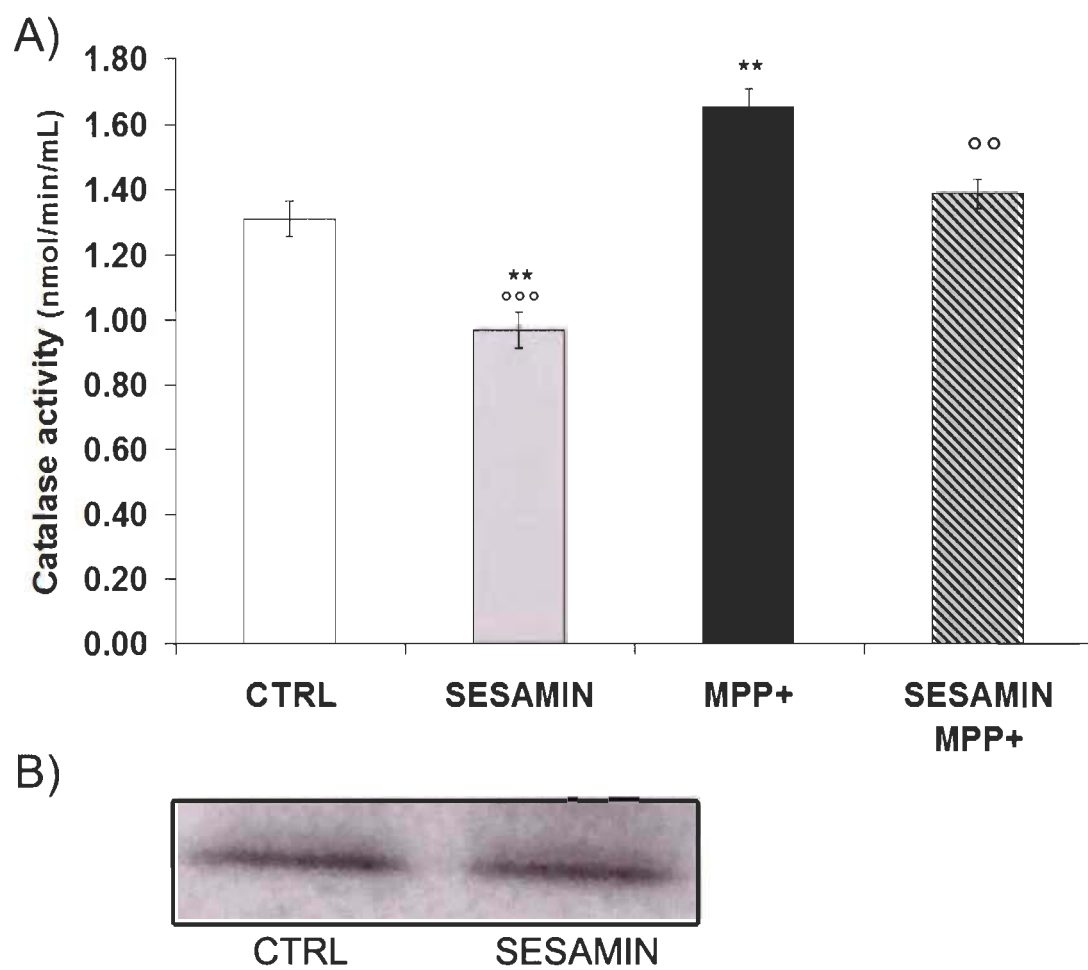


Figure 5

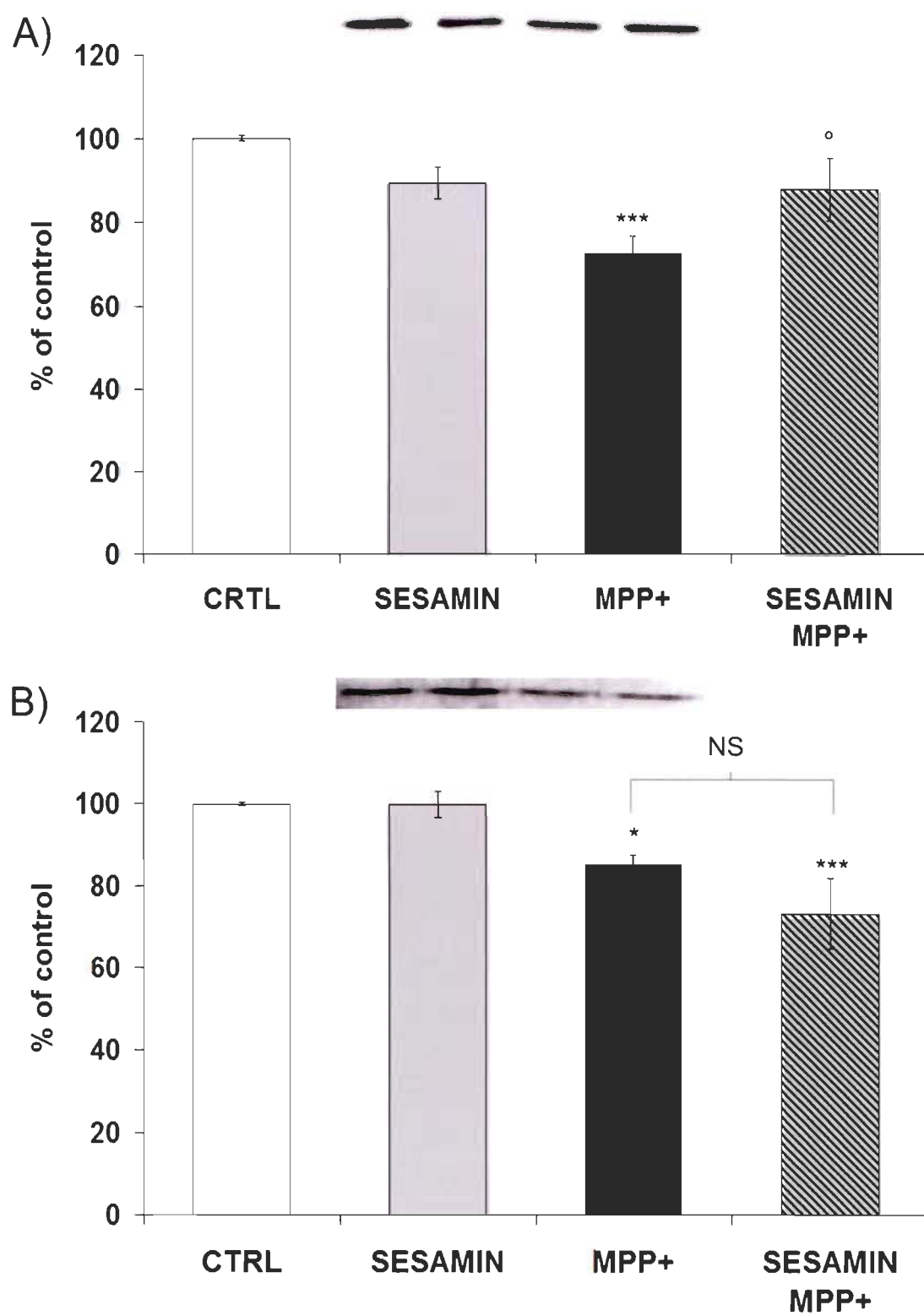
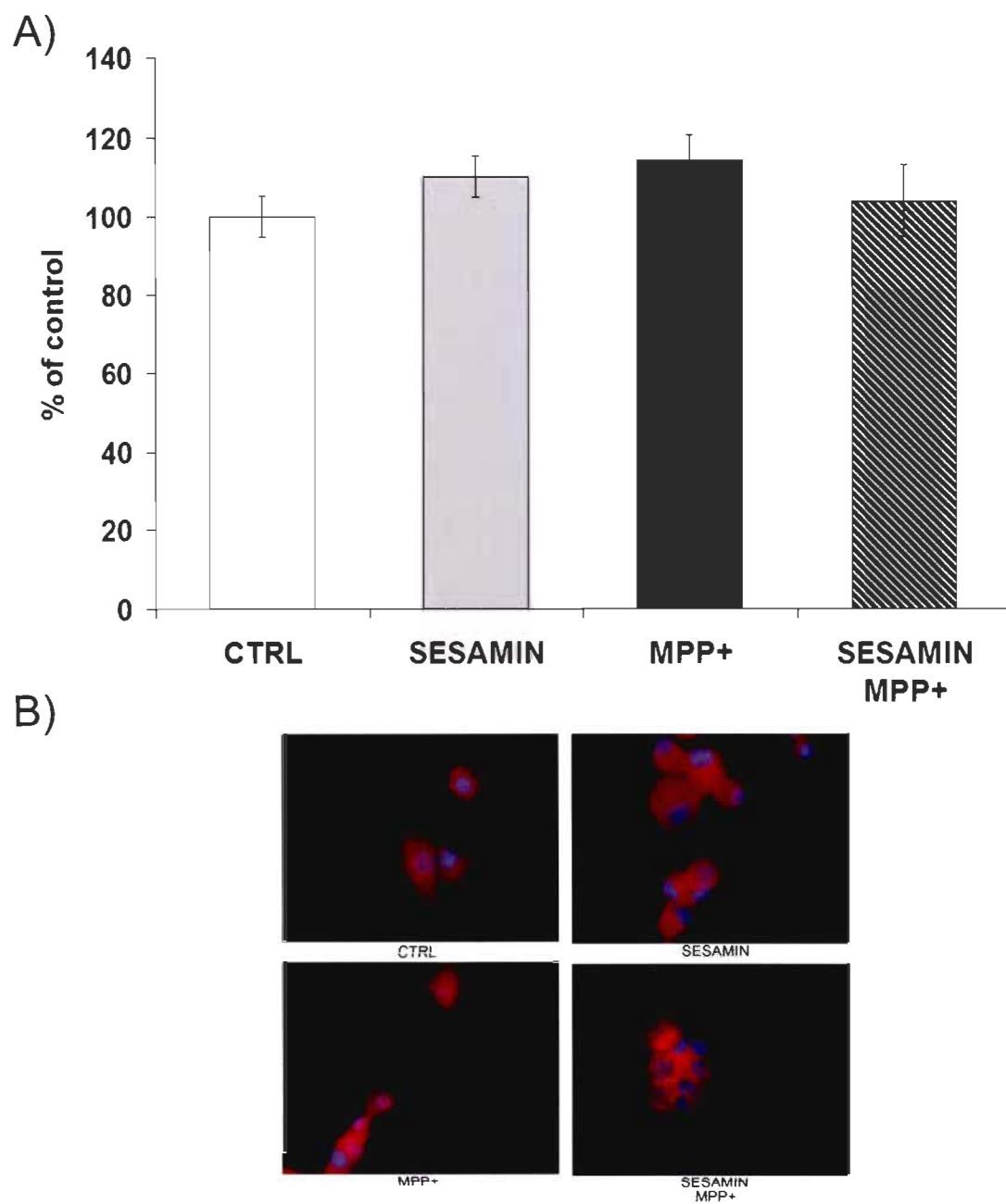
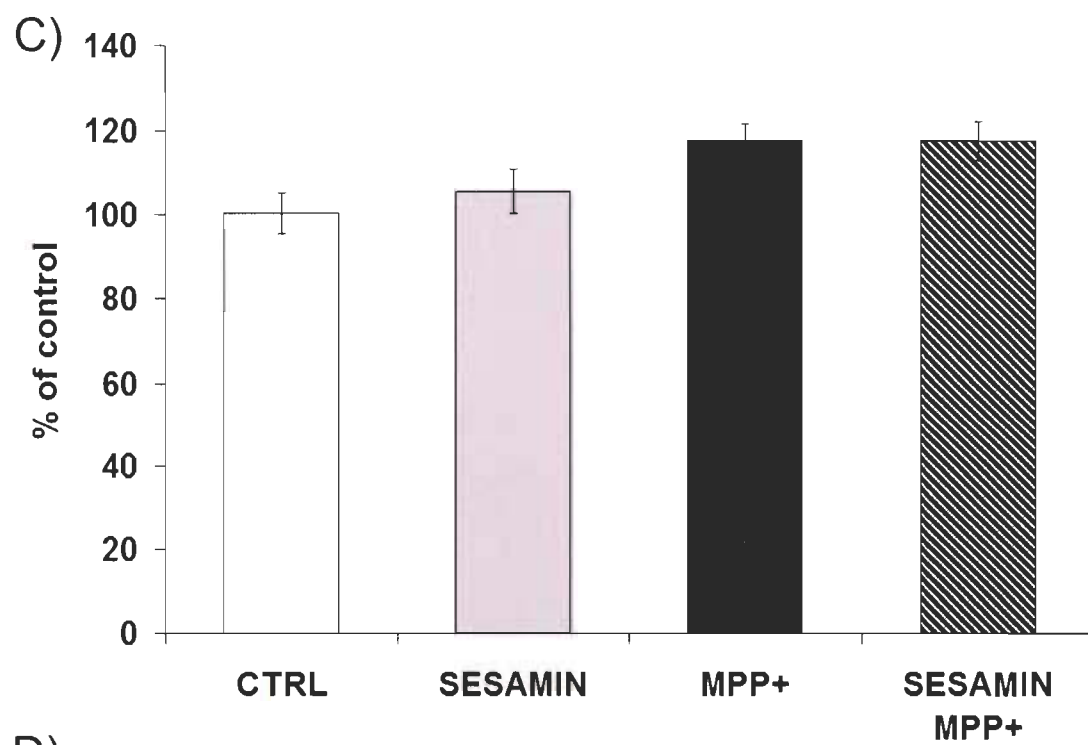


Figure 6





D)

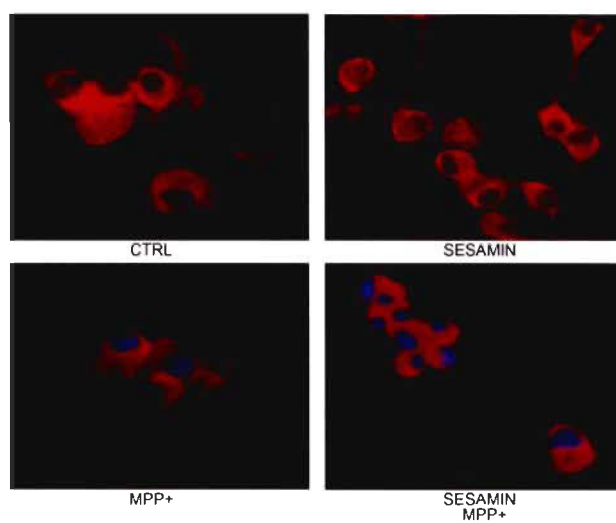


Figure 7

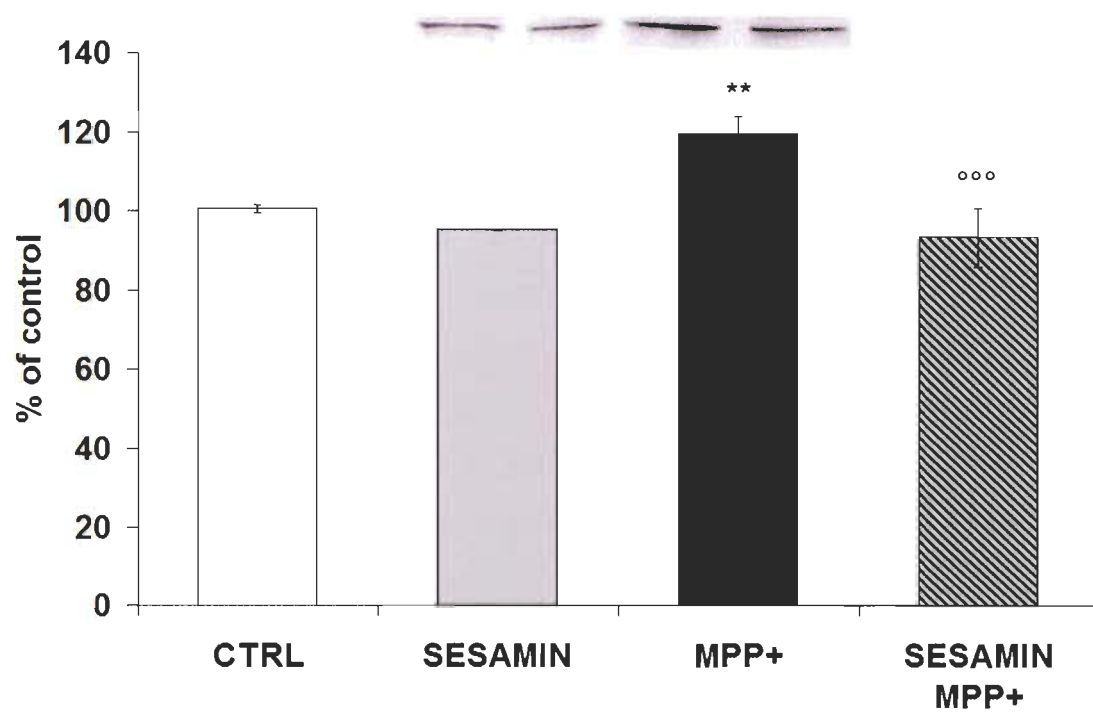
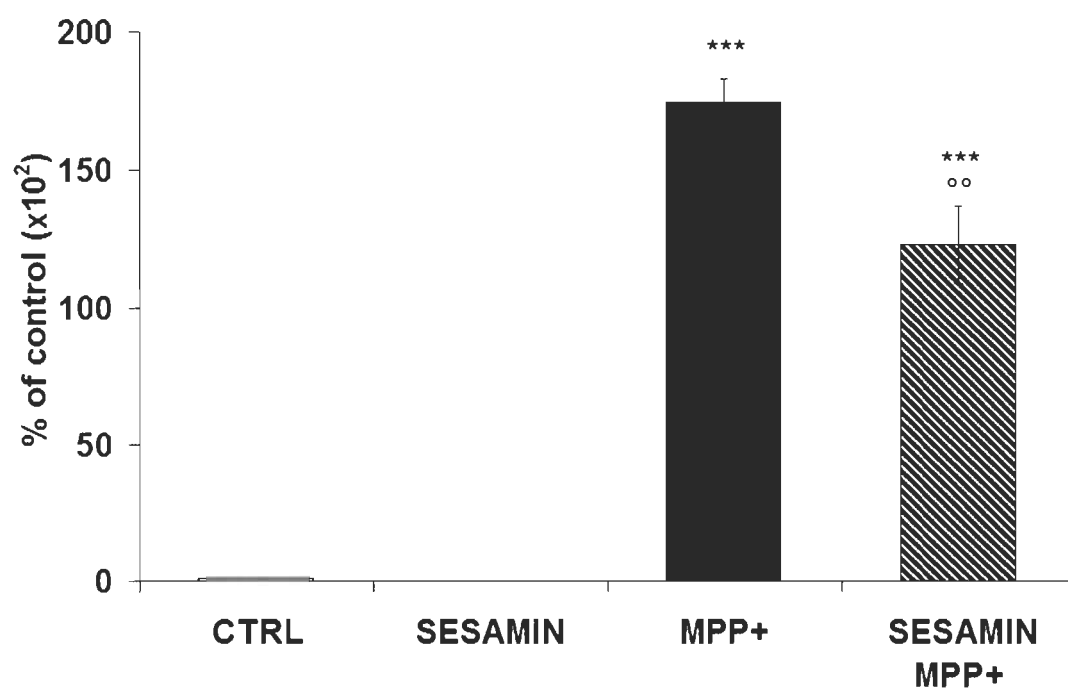


Figure 8



CHAPITRE IV

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE

Dans ce chapitre, je présente des résultats complémentaires à mon article qui ne sont pas publiés. Certains résultats concernent mes expériences contrôles de dose réponse alors que d'autres sont en lien avec des résultats publiés dans l'article. Ces derniers démontrent différentes techniques utilisées pour évaluer la modulation des différentes molécules étudiées. Les résultats concernant les objectifs 1 et 2 sont tous présentés dans l'article.

4.1 Dose réponse du MPP+ sur des neurones en culture

Dans le but de savoir quelle concentration en MPP+ il faut utiliser pour obtenir environ 30 à 40 % de mortalité cellulaire, une courbe dose réponse du MPP+ a été réalisée sur des PC12 natives et différenciées. Comme le démontre la figure 3.1, une concentration de 5 mM en MPP+ est nécessaire obtenir le pourcentage de mortalité cellulaire désiré en 24h.

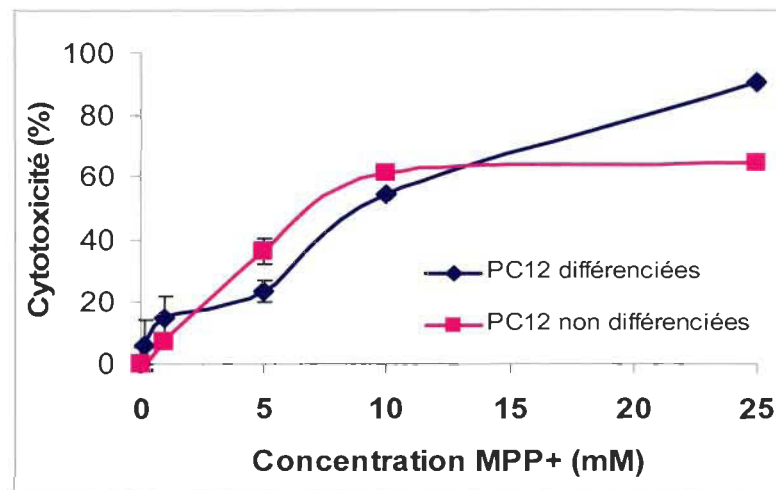


FIGURE 4.1 : Dose réponse du MPP+ sur des cellules neuronales en culture

4.2 Dose réponse de la sésamine

La concentration optimale en sésamine utilisée lors des différentes expériences a été sélectionnée à partir des données obtenues lors de la dose réponse (figure 3.2). Ce test a été effectué sur des cellules PC12 natives. L'évaluation de l'effet de la sésamine suite à l'induction d'un stress oxydant a permis d'établir que la sésamine 10^{-12} M était la concentration avec laquelle les résultats obtenus étaient optimaux.

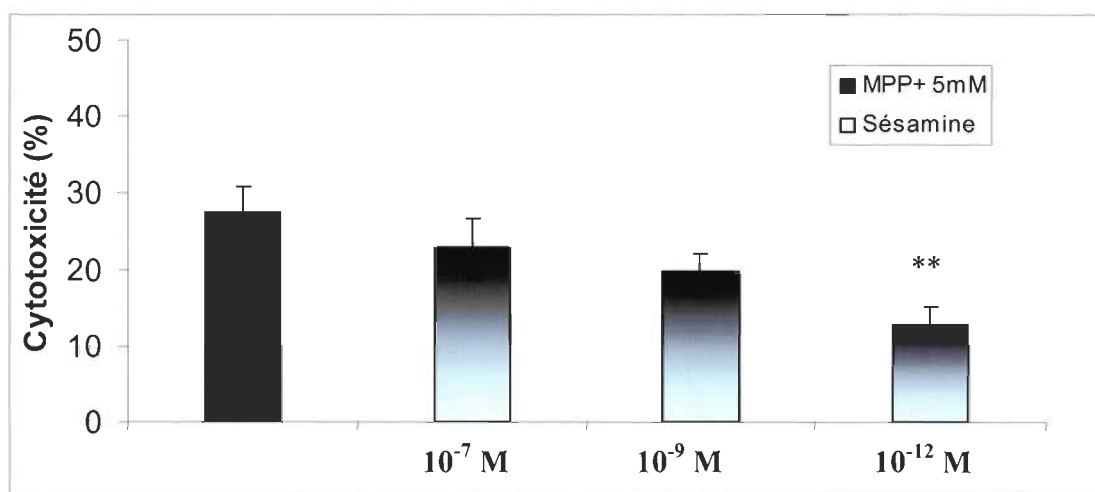


FIGURE 4.2 : Dose réponse de la sésamine sur des cellules PC12 natives

4.3 Objectif 3 : Vérifier le potentiel oestrogénique de la sésamine en étudiant le niveau d'expression des ERs α et β .

4.3.1 La sésamine ne module pas le ER- β , tel que montré par la technique d'immunobuvardage de type « western » et RT-PCR.

Les résultats de la figure 6 de l'article ([section IV](#)) démontrent clairement que les protéines des récepteurs oestrogéniques ne sont pas modulées par la sésamine tel que montré par immunofluorescence. Des résultats supplémentaires en immunobuvardage de type « western » confirment que la protéine (figure 3.3) et, par RT-PCR, que l'ARNm du ER- β (figure 3.4) ne sont pas affectés par un traitement de sésamine.

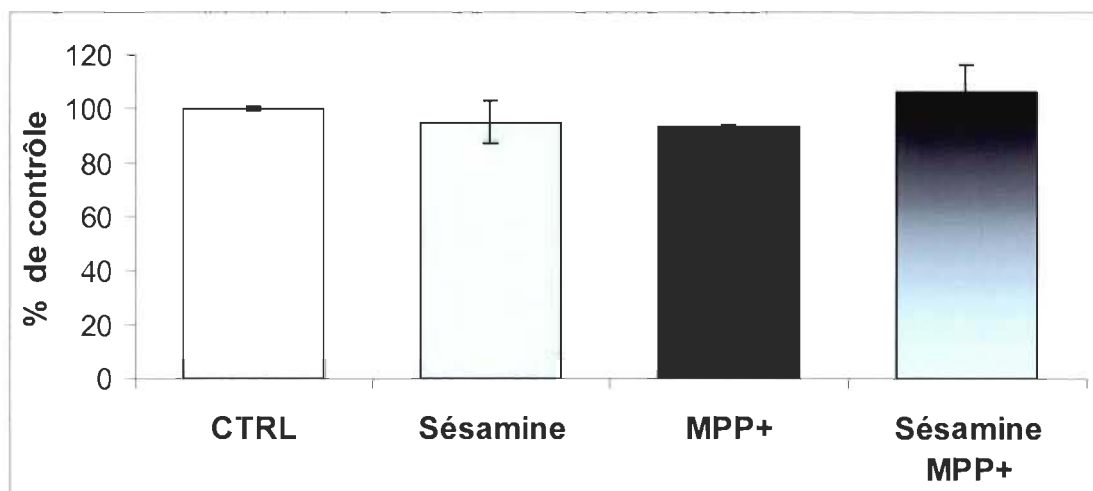


FIGURE 4.3 : Expression de la protéine du ER- β par la technique de « western blot »

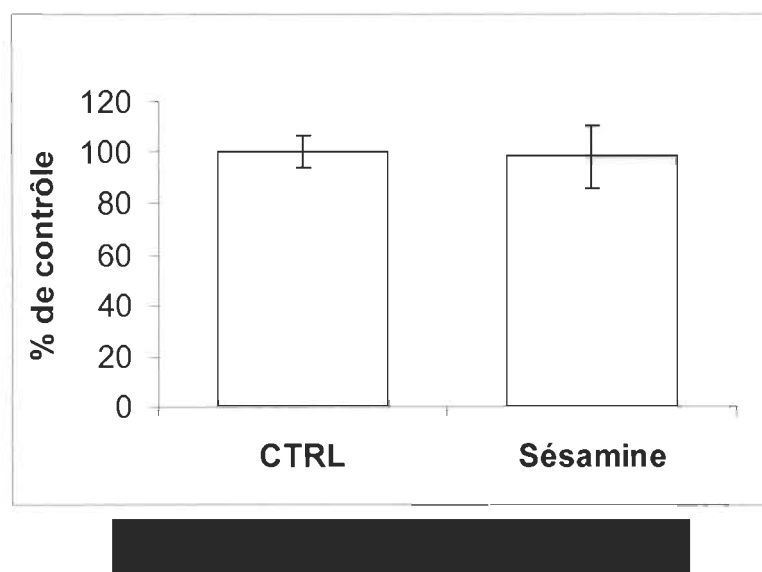


FIGURE 4.4 : Expression de l'ARNm du ER- β suite à un traitement de sésamine

4.4 Objectif 4 : Évaluer la capacité de la sésamine à modifier les trois principaux marqueurs d'identité neuronale DAergique : DAT, TH et la DA.

4.4.1 Effet de la sésamine sur l'ARNm de la TH

Dans un premier temps, j'ai vérifié l'effet de la sésamine sur l'expression de la protéine TH. Cette enzyme est l'étape limitante dans la synthèse de la DA. J'ai donc analysé la modulation de la protéine TH par « western blot » (résultat 5A de l'article). Dans ce chapitre, je démontre une diminution du niveau d'ARNm de la TH (figure 3.5) suite au traitement des cellules avec la sésamine et le MPP⁺. Lorsqu'on compare les deux graphiques, il est intéressant de constater que la modulation de la protéine (voir figure 5A de l'article) et de l'ARNm de TH se fait sensiblement de la même façon.

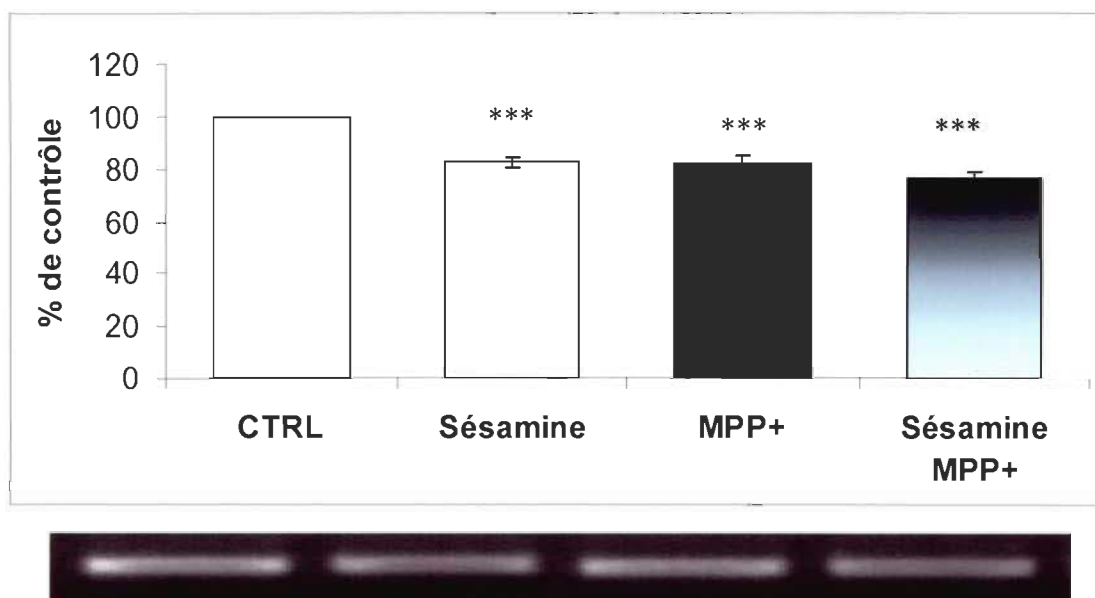


FIGURE 4.5 : Modulation de l'ARNm de la TH suite à un traitement avec la sésamine et à l'induction d'un stress oxydant

4.4.2 Effet de la sésamine sur la concentration intracellulaire de la DA

Afin de déterminer l'effet de la sésamine sur la production de DA ou indirectement sur l'activité de la TH, j'ai dosé la DA dans les PC12 différenciées. Comme la figure 4.6 le démontre, la sésamine n'affecte pas le niveau intracellulaire de DA dans les neurones en culture, alors qu'un traitement avec le MPP+ augmente considérablement le niveau de DA.

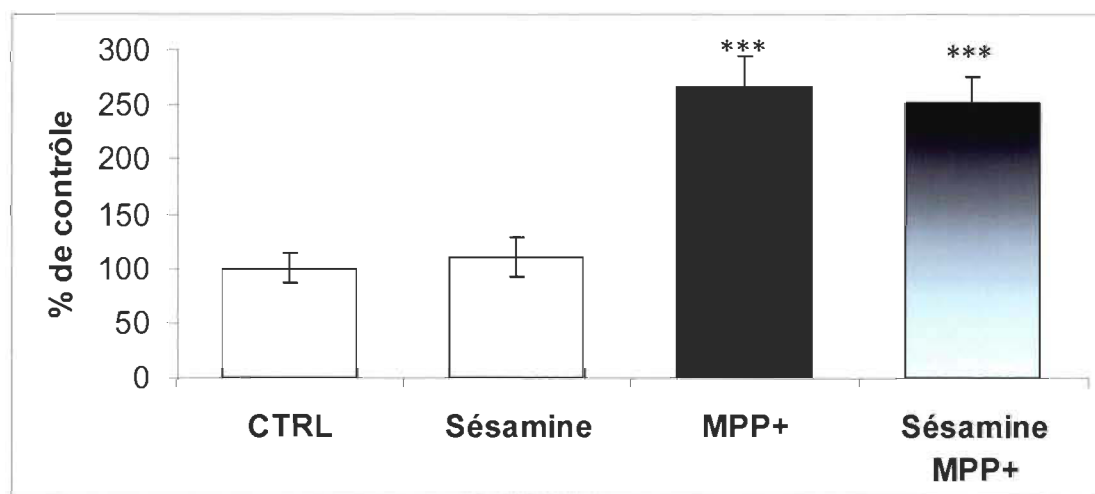


FIGURE 4.6 : Dosage de la DA dans des cellules PC12 différenciées

4.4.3 Effet de la sésamine sur l'ARNm du DAT

Le niveau d'expression de la protéine DAT (article section IV, figure 5B) par immunobuvardage de type « western » et de l'ARNm du DAT par RT-PCR (figure 4.7) a aussi été évalué. Les deux graphiques démontrent que le traitement des cellules en culture par le MPP⁺ et le cotraitement sésamine MPP⁺, sont associés à une diminution de l'expression du DAT. Toutefois, on obtient une différence entre les deux résultats concernant le traitement avec la sésamine seule. En effet, l'étude de la modulation de ce transporteur démontre que la sésamine diminue l'ARNm de ce dernier alors que l'étude de la protéine DAT nous révèle que cette protéine n'est pas modulée par la sésamine.

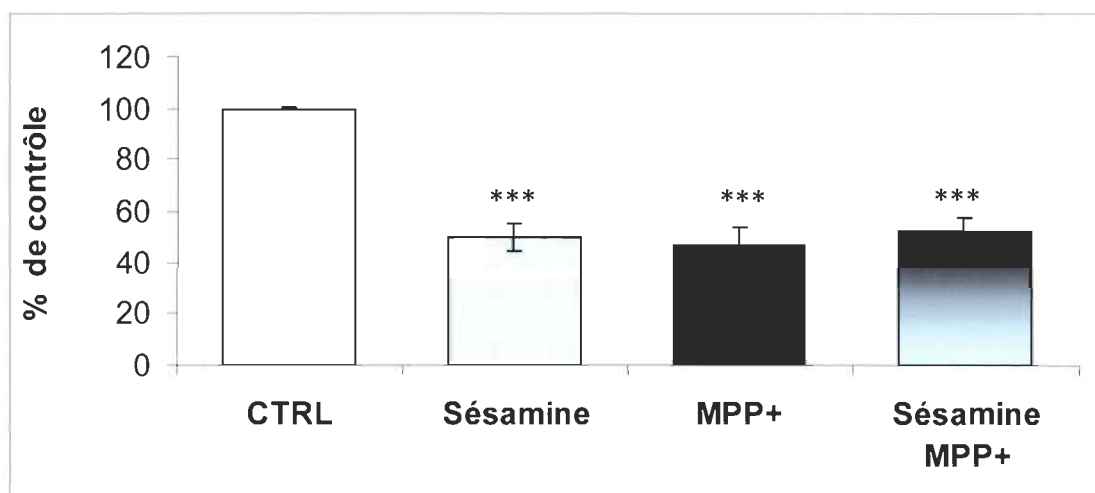


FIGURE 4.7 : Effet de la sésamine sur le niveau d'ARNm du DAT

CHAPITRE V

DISCUSSION

5.1 Synthèse des résultats et Interprétation

Dans le but de prévenir ou encore de ralentir l'évolution de maladies neurodégénératives telles que la MP, l'étude des molécules antioxydantes présentes dans notre alimentation prend de plus en plus d'ampleur. La sésamine est une molécule antioxydante dont l'étude est particulièrement intéressante du fait qu'elle exerce des actions physiologiques à une concentration de l'ordre du picomolaire. En effet, ceci est la concentration normalement retrouvée dans le sang de plusieurs polyphénols naturels. Lors de mes recherches, j'ai utilisé une lignée cellulaire reconnue comme étant un modèle pour l'étude *in vitro* des neurones DAergiques, les PC12. En effet, cette lignée cellulaire possède plusieurs caractéristiques des neurones DAergiques telles que leur capacité à produire, emmagasiner et sécréter la DA, à exprimer les récepteurs de la DA, le DAT, les neurofilaments et d'autres molécules d'intérêts comme les ERs [7, 8, 132, 133].

Mon projet de recherche comprenait plusieurs objectifs distincts. En premier lieu, je devais vérifier si la sésamine, un composé retrouvé dans les graines de sésame, avait la capacité de diminuer la mortalité cellulaire induite par le MPP⁺, et aussi déterminer à quelle concentration la sésamine est la plus efficace. Certaines études ont déjà dévoilé le côté neuroprotecteur de la sésamine suite à l'induction de stress oxydant par la roténone, le fer et par hypoxie [71, 116, 161]. Mes résultats démontrent qu'un prétraitement avec la sésamine 10^{-12} M diminue de 60 % la cytotoxicité engendrée par le MPP⁺. Ce qui permet de conclure que la sésamine 10^{-12} M protège les neurones en culture des effets néfastes d'un stress oxydant causé par le MPP⁺.

Ensuite, j'ai voulu vérifier le potentiel antioxydant de la sésamine en analysant sa capacité à éliminer les RL. La rhodamine 123 est un fluorochrome sensible à

l'oxydation [66, 122], elle permet de visualiser le niveau de RL directement dans les neurones en culture. Selon mes résultats, le MPP+ augmente considérablement le niveau de RL dans les neurones en cultures [66]. Tandis qu'un prétraitement avec la sésamine permet de réduire la fluorescence induite par le MPP+ jusqu'aux valeurs contrôles. Il est ainsi possible de conclure que la sésamine est une substance antioxydante qui a la capacité d'éliminer les RL générés par le MPP+. J'ai aussi voulu vérifier l'effet de cette molécule sur la SOD, une enzyme impliquée dans l'élimination des RL. Ainsi, j'ai étudié le niveau d'activité de la SOD. Les résultats démontrent que la sésamine augmente l'activité ainsi que l'expression des protéines de la SOD dans les neurones en culture. De ce fait, il est possible de déduire qu'une cellule ayant été prétraitée avec la sésamine est plus apte à faire face à certains dommages oxydatifs qu'une cellule n'ayant subi aucun traitement. L'induction d'un stress oxydant augmente aussi l'activité de cette enzyme, tel que déjà démontré dans la littérature[167-169]. Il est possible que la cellule réagisse à l'augmentation de RL causés par le MPP+ et essaie de se protéger de cette façon. L'augmentation de l'activité de la SOD par le MPP+ serait un mécanisme compensatoire, tel que déjà démontré dans mon article [167].

Mes collègues de laboratoire ont aussi vérifié l'effet de la sésamine sur l'activité d'une autre enzyme antioxydante, la catalase. Les résultats démontrent qu'un prétraitement avec la sésamine réduit l'augmentation l'activité de la catalase causée par le MPP+ (voir article section IV, figure 4). Le niveau d'expression de iNOS, une enzyme responsable de la production de NO, a aussi été analysé. Les résultats (voir article section IV, figure 7) révèlent que la sésamine diminue les effets néfastes causés par le MPP+, c'est-à-dire qu'elle diminue l'augmentation de iNOS. Ces deux résultats confirment que la sésamine a la capacité d'éliminer les RL.

Comme la sésamine est un phytoestrogène et que ses molécules sont reconnues pour avoir des activités oestrogéniques et non oestrogéniques, j'ai vérifié si la neuroprotection médiée par la sésamine modulait l'expression des ERs, comme l'oestrogène le fait[8]. L'ensemble des résultats de cette section démontre bien d'une part, que comme il a déjà été établi, le MPP+ ne module pas ces récepteurs [8] et d'autre

part, que la sésamine ne module pas les ERs, non plus. De ce fait, il est possible de conclure que les ERs ne sont pas impliqués dans la neuroprotection par la sésamine. Ce résultat est intéressant car il établit que la sésamine n'interfère pas avec les voies oestrogéniques.

Pour terminer, j'ai voulu examiner l'effet de la sésamine sur les neurones DAergiques. J'ai ainsi évalué l'effet de ce lignan sur l'expression du DAT, de la TH et j'ai aussi dosé la DA dans les neurones en culture suite aux traitements des PC12 avec la sésamine. Mes résultats démontrent que la sésamine seule ne module pas significativement le niveau de la protéine TH (voir article section IV, figure 4A) et diminue légèrement l'ARNm de la TH. Dans les deux cas, le MPP⁺ diminue significativement l'expression de la TH, comme attendu [170]. Alors qu'un prétraitement avec la sésamine permet de diminuer la perte de la protéine TH générée par le MPP⁺ et de ramener l'expression de la protéine TH vers des valeurs contrôle. Ce résultat m'indique que, contrairement à mon hypothèse, la sésamine n'augmente pas le niveau d'expression de la protéine TH. Ce résultat qui m'amène à me poser une autre question : Est-ce que la sésamine, sans augmenter la quantité de la protéine TH, a la capacité d'augmenter l'activité de la TH? J'ai donc vérifié, de façon indirecte, l'activité de cette enzyme en évaluant l'effet de la sésamine sur le niveau de DA intracellulaire. Comme la TH est l'enzyme limitante dans la synthèse de la DA, une augmentation de son activité conduirait à une augmentation en DA par rapport au niveau contrôle, ce qui serait favorable étant donné que la DA est le neurotransmetteur dont la concentration baisse radicalement chez les parkinsoniens. Mes résultats démontrent plutôt que la sésamine ne module pas le niveau de DA intracellulaire. Toutefois, il est possible de conclure que sans altérer le niveau de DA et de la protéine TH, la sésamine est capable de prévenir la perte de la protéine TH causée par le stress oxydant. Ce qui est logique, car il a déjà été prouvé que la TH perd son activité en présence de RL [171], comme la sésamine a une activité antioxydante, il se peut qu'elle récupère le niveau d'expression de la protéine TH grâce à son activité antioxydante.

Mes résultats montrent aussi que, suite à l'induction d'un stress oxydant par le MPP+, le niveau de DA intracellulaire est augmenté. La majorité des études démontrent pourtant que le MPP+ cause un efflux extracellulaire de DA [172, 173]. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer mon résultat serait qu'un problème d'ordre technique est survenu lors de ce dosage. En effet, j'ai vérifié en premier lieu qu'il n'y avait pas d'interférences possibles entre le protocole de dosage de la DA et le MPP+. Après vérification, cette hypothèse s'est avérée non concluante. Puis, après réflexion, l'explication la plus logique pour expliquer l'augmentation de la quantité de DA intracellulaire serait qu'il y a eu un problème au niveau de la lyse cellulaire. Au départ, quand j'ai mis au point le protocole, je voulais être certaine d'employer une technique de lyse douce qui n'oxyderait pas la DA. J'ai donc opté pour trois cycles « de gel et dégel » pour lyser la membrane de mes cellules. En effet, la DA intracellulaire est majoritairement retrouvée dans les vésicules cytoplasmiques et le MPP+ entre dans ces mêmes vésicules et provoque la sortie de la DA des vésicules vers le cytoplasme. De cette façon, advenant le cas que la technique de lyse cellulaire employée soit assez efficace pour lyser la membrane cellulaire mais pas la membrane des vésicules, on obtient une grosse augmentation lors du dosage de la DA dans les conditions où le MPP+ a été employé. Je propose, ci-dessous, un schéma explicatif.

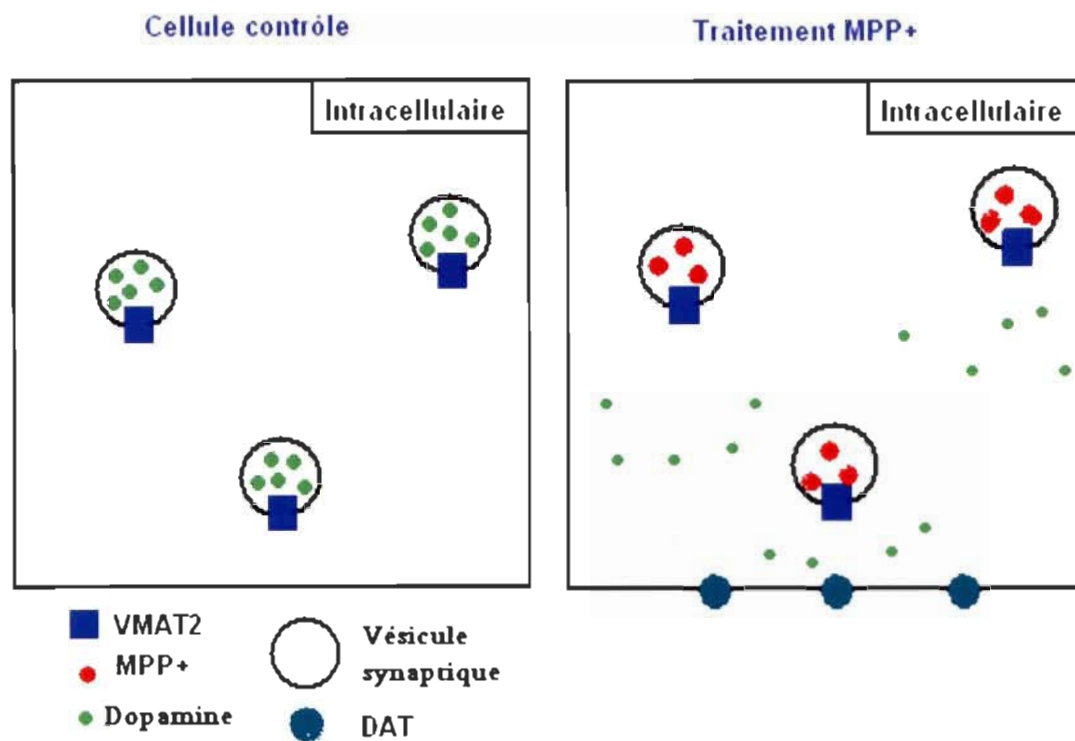


FIGURE 5.1 : Schéma explicatif de la sortie de la DA intravésiculaire suite à un traitement avec le MPP+.

J'ai ensuite analysé l'effet de la sésamine sur l'ARNm et la protéine DAT. Ce transporteur exclusif aux neurones DAergiques est impliqué dans la recapture de la DA, il joue donc un rôle crucial dans la neurotransmission médiée par la DA. En effet, il régularise la durée et l'amplitude du signal DAergique. Des études ont démontré qu'une souris transgénique qui surexprime le DAT est plus sensible à la toxicité générée par le MPP+, ce qui se traduit par une augmentation de la mortalité des neurones DAergiques [174]. Une autre étude dévoile qu'une souris DAT « knock-out » est résistante à la mortalité cellulaire induite par le MPP+ [174]. Plusieurs auteurs ont déjà démontré que le MPP+ diminue l'expression du DAT [93, 175]; ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que les cellules cherchent un moyen compensatoire à la perte de neurone DA et par le fait même à la diminution de la DA. En effet, une diminution de l'expression de DAT serait un moyen intéressant d'augmenter la demi-vie de la DA dans l'espace extracellulaire [174]. Mes résultats démontrent aussi que l'ARNm et les protéines de ce transporteur sont diminués par le traitement avec le MPP+ [170] et le cotraitement sésamine MPP+. Ce qui indique que la sésamine n'empêche pas la diminution de

l'expression du DAT causée par un stress oxydant. Le traitement des neurones DAergiques avec la sésamine seule diminue l'expression de l'ARNm du DAT, mais ne module pas la protéine DAT dans les conditions utilisées. Ce résultat est intéressant, car une diminution de l'expression de DAT par la sésamine serait un bon moyen d'augmenter la biodisponibilité de la DA dans la fente synaptique. Je crois que la différence entre ces deux résultats peut être expliquée par le fait que ces deux tests ont été fait 24h après le traitement, il se peut que si le test de l'évaluation des protéines avait été effectuée plus tard, on ait vu une diminution de l'expression des protéines du DAT suite au traitement avec la sésamine. D'autres expériences devront être faites afin de trouver une explication spécifique à ce résultat. (Voir section 5.2)

Tous ces résultats, regardés dans l'ensemble, nous révèlent quelque chose de très intéressant sur la sésamine. Sachant que le niveau d'expression de DAT et de la TH est diminué suite à un traitement avec la sésamine, on s'attend à une baisse du niveau de DA intracellulaire pour la condition sésamine par rapport à une condition contrôle. Toutefois, le dosage de la DA intracellulaire nous révèle qu'il y a la même concentration de DA intracellulaire dans la condition contrôle et dans la condition sésamine. Donc, l'ensemble de ces résultats indique que la sésamine augmente effectivement l'activité de la TH. D'autres expériences devront être effectuées à propos de l'activité de la TH et devront être fait au laboratoire afin de confirmer cette hypothèse.

Dans notre laboratoire, certaines de mes collègues étudient l'hypothèse de la neuroinflammation en évaluant l'effet des phytoestrogènes sur dans la genèse de la MP. Dans cette optique, elles ont évalué l'effet de la sésamine sur l'expression de l'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire. Cette molécule est impliquée dans la genèse de la neuroinflammation. Les résultats (voir article section IV, figure 8) révèlent que la sésamine a aussi un rôle anti-inflammatoire. En effet, la sésamine diminue l'augmentation de IL-6 provoquée par le MPP+.

5.2 Perspectives de recherche

Les résultats de mes recherches sont très encourageants, toutefois il serait intéressant de faire encore des expériences *in vitro* afin de mieux comprendre le mode d'action de la sésamine. En effet, l'analyse de mes résultats m'emmène à me poser de nouvelles questions. Dans un premier temps, je serai curieuse d'évaluer la capacité de la sésamine à moduler l'activité de la GSH, une autre enzyme responsable de l'élimination des RL. Ensuite, on sait que le DAT est responsable de la recapture de la DA de la fente synaptique vers le neurone présynaptique. Alors, je me demande pourquoi la sésamine diminue l'expression de l'ARNm du DAT sans altérer le niveau intracellulaire de DA. Soit c'est une question de cinétique, comme la protéine de DAT n'est pas modulée par la sésamine après 24 h il est normal qu'il n'y ait pas eu de changement dans la recapture de la DA. Pour vérifier cette hypothèse, je ferais une étude de l'expression de la protéine de DAT et du niveau de DA intracellulaire en fonction du temps (une étude cinétique). Advenant le cas qu'il n'y ait aucune variation du niveau de DA dans le temps, il serait intéressant d'étudier l'effet de la sésamine sur la localisation du DAT. Ce transporteur n'est pas seulement exprimé au niveau de la fente synaptique, on le retrouve aussi sous forme inactive, internalisée dans la cellule [176]. Ainsi, il est possible que la sésamine cause une expression supérieure du DAT au niveau de la fente synaptique et augmente ainsi la capacité de ce dernier à réinternaliser la DA. Pour vérifier l'effet de la sésamine sur la localisation du DAT, j'utiliserais une lignée cellulaire qui exprime le DAT couplé à la GFP (protéine à fluorescence verte) en microscopie confocale. Cette technique permet de voir, en fonction du temps, la localisation du DAT [176].

Il serait aussi intéressant d'aller vérifier directement l'effet de la sésamine sur l'activité homospécifique (activité par enzyme) de la TH. Pour ce faire, il suffit d'analyser parallèlement la quantité de protéine et l'activité enzymatique d'un échantillon. Il serait ainsi possible de confirmer mon hypothèse concernant l'augmentation de l'activité de la TH par la sésamine.

Pour valider mon hypothèse par rapport à l'augmentation du niveau de DA intracellulaire par le MPP+, il suffirait de reprendre l'expérience avec un inhibiteur de VMAT2. Cet inhibiteur empêcherait le MPP+ d'entrer dans les vésicules synaptiques et par le fait même inhiberait la sortie de la DA des vésicules vers le cytoplasme. Mon hypothèse sera confirmée si la présence de l'inhibiteur du transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT2) ramène le niveau de DA intracellulaire vers des valeurs contrôles.

Poursuivre l'étude de l'effet de la sésamine sur la neuroinflammation et en savoir plus sur les mécanismes impliqués dans la protection de la sésamine contre la neuroinflammation.

À la lumière de tous mes résultats concernant la sésamine, je crois qu'il serait très intéressant de pousser l'étude des effets de cette molécule plus loin, et tester la sésamine *in vivo*. Mes résultats démontrent bien les bienfaits de la sésamine *in vitro*, toutefois faire des expérimentations sur des cellules en culture est tout à fait différent que faire les mêmes tests sur un organisme complet tel que la souris. Ainsi, il serait possible de savoir si la sésamine conserve ses bienfaits dans un organisme vivant.

5.3 Conclusion

L'étude des molécules naturelles ayant des propriétés bénéfiques pour la santé et qui sont présentes dans notre alimentation, est de plus en plus populaire. La sésamine, une molécule présente dans les graines de sésame, possède une action antioxydante et anti-inflammatoire. Il est ainsi possible de penser que la consommation de sésamine pourrait ralentir l'évolution de la MP ou encore mieux la prévenir.

Augmenter notre consommation d'aliments nutraceutiques comme la sésamine permettrait de diminuer les effets du vieillissement et le développement de maladies tel que la MP; ce qui serait positif pour la population vieillissante.

BIBLIOGRAPHIE

1. Viartis, *medical researchers specializing in PD*
2. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy. 1817.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
3. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models.* Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
4. Stokes, N.K.e.J., *Série de monographies sur les maladies liées au vieillissement : XII. Maladie de Parkinson - Percées récentes et nouvelles orientations.* Maladie Chronique de Canada, 2000. **20** no 2.
5. Wooten, G.F., et al., *Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004. **75**(4): p. 637-9.
6. Chade, A.R., M. Kasten, and C.M. Tanner, *Nongenetic causes of Parkinson's disease.* J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 147-51.
7. Chiasson, K., et al., *Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently.* J Mol Neurosci, 2006. **30**(3): p. 297-310.
8. Gelinas, S. and M.G. Martinoli, *Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells.* J Neurosci Res, 2002. **70**(1): p. 90-6.
9. Dluzen, D. and M. Horstink, *Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies.* Endocrine, 2003. **21**(1): p. 67-75.
10. Wenger, N.K., *[Menopausal hormone therapy and cardiovascular disease].* Rev Esp Cardiol, 2006. **59**(10): p. 1058-69.
11. Hoffman, G.E., I. Merchenthaler, and S.L. Zup, *Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease.* Endocrine, 2006. **29**(2): p. 217-31.
12. Cholerton, B., et al., *Estrogen and Alzheimer's disease: the story so far.* Drugs Aging, 2002. **19**(6): p. 405-27.
13. Bains, M., J.C. Cousins, and J.L. Roberts, *Neuroprotection by estrogen against MPP+-induced dopamine neuron death is mediated by ERalpha in primary cultures of mouse mesencephalon.* Exp Neurol, 2007. **204**(2): p. 767-76.

14. Khealani, B.A. and S.M. Baig, *Clinical spectrum of Parkinson's disease from Pakistan*. Singapore Med J, 2006. **47**(12): p. 1075-9.
15. Moore, D.J., et al., *Molecular pathophysiology of Parkinson's disease*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 57-87.
16. Priyadarshi, A., et al., *A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides*. Neurotoxicology, 2000. **21**(4): p. 435-40.
17. Pollak, *La Maladie de Parkinson*. 2004, France.
18. Association, C.M.,
<http://www.cma.ca/Public/DiseaseLibrary/PatientInfo.asp?diseaseid=102&agree=true>, CMA.
19. wikipédia, *Encyclopédie*
20. Lang, A.E., *The progression of Parkinson disease: a hypothesis*. Neurology, 2007. **68**(12): p. 948-52.
21. Tolosa, E., G. Wenning, and W. Poewe, *The diagnosis of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2006. **5**(1): p. 75-86.
22. Lieberman, A., *Depression in Parkinson's disease -- a review*. Acta Neurol Scand, 2006. **113**(1): p. 1-8.
23. Ishihara, L. and C. Brayne, *A systematic review of depression and mental illness preceding Parkinson's disease*. Acta Neurol Scand, 2006. **113**(4): p. 211-20.
24. Koenig, O., C. Thomas-Anterion, and B. Laurent, *Procedural learning in Parkinson's disease: intact and impaired cognitive components*. Neuropsychologia, 1999. **37**(10): p. 1103-9.
25. Moellentine, C., et al., *Effectiveness of ECT in patients with parkinsonism*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1998. **10**(2): p. 187-93.
26. Derkinderen*, P., *MALADIE DE PARKINSON ET DÉCLIN COGNITIF*. Neurologies, 2003. **octobre**(NEURO54_p416a420): p. 416.
27. Santos, M.L., *Brain arteriovenous malformations: morphological characterization and clinical correlation*. Arq Neuropsiquiatr, 2008. **66**(1): p. 139.
28. Fernandez, H.H., *What we have learned about sleep disorders and psychosis after nearly two centuries of Parkinson's disease. Summary and conclusions*. CNS Spectr, 2008. **13**(3 Suppl 4): p. 34-5.

29. Drukarch, B., et al., *Glutathione is involved in the granular storage of dopamine in rat PC 12 pheochromocytoma cells: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease*. J Neurosci, 1996. **16**(19): p. 6038-45.
30. Purves, A., Fitzpatrick, Katz, Lamantia, McNamara, Williams, *Neuroscience*, ed. D. Boeck. 2004, Bruxelles, France.
31. *Fédération Québécoise des Sociétés Alzheimer*.
32. Zhang, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(4): p. 240-50.
33. Nagatsu, T. and M. Sawada, *Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects*. J Neural Transm Suppl, 2007(72): p. 113-20.
34. Enochs, W.S., et al., *The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis*. J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1994. **7**(2): p. 83-100.
35. Kedar, N.P., *Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease?* J Postgrad Med, 2003. **49**(3): p. 236-45.
36. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S26-36; discussion S36-8.
37. Emmanuel Broussolle, P.D.e.G.F., *MALADIES DU MOUVEMENT Génétique, stratégie préventive et neurochirurgie fonctionnelle*. neurologie, 2003. **6** (avril 2003).
38. Hardy, J., et al., *Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism*. Ann Neurol, 2006. **60**(4): p. 389-98.
39. Mata, I.F., P.J. Lockhart, and M.J. Farrer, *Parkin genetics: one model for Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2004. **13 No 1**: p. R127-33.
40. Corti, O. and A. Brice, *[Parkinson's disease: what have we learned from the genes responsible for familial forms?]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(5): p. 613-9.
41. NCBI.
42. Cookson, M.R., J. Hardy, and P.A. Lewis, *Genetic neuropathology of Parkinson's disease*. Int J Clin Exp Pathol, 2008. **1**(3): p. 217-31.
43. Zhu, X., et al., *LRRK2 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*. Mol Neurodegener, 2006. **1**: p. 17.

44. Mata, I.F., et al., *LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights*. Trends Neurosci, 2006. **29**(5): p. 286-93.
45. Vila, M. and S. Przedborski, *Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S58-62.
46. D'Amato, R.J., Z.P. Lipman, and S.H. Snyder, *Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin*. Science, 1986. **231**(4741): p. 987-9.
47. Thrash, B., et al., *Paraquat and maneb induced neurotoxicity*. Proc West Pharmacol Soc, 2007. **50**: p. 31-42.
48. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10756-64.
49. Shimoji, M., et al., *Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. **134**(1): p. 103-8.
50. Forno, L.S., et al., *Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations*. Adv Neurol, 1993. **60**: p. 600-8.
51. Kowall, N.W., et al., *MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons*. Neuroreport, 2000. **11**(1): p. 211-3.
52. Vila, M., et al., *Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP*. J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 721-9.
53. Schober, A., *Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 215-24.
54. Zhang, J., et al., *Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons*. Am J Pathol, 1999. **154**(5): p. 1423-9.
55. Jenner, P., et al., *Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group*. Ann Neurol, 1992. **32 Suppl**: p. S82-7.
56. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders*. Pathol Biol (Paris), 1996. **44**(1): p. 57-64.
57. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S18-25.

58. Mancuso, M., et al., *Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration*. J Alzheimers Dis, 2006. **10**(1): p. 59-73.
59. LaVoie, M.J. and T.G. Hastings, *Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine*. J Neurosci, 1999. **19**(4): p. 1484-91.
60. Hagen, N.A., B.P. O'Neill, and P.J. Kelly, *Computer assisted stereotactic placement of Ommaya reservoirs for delivery of chemotherapeutic agents in cancer patients*. J Neurooncol, 1987. **5**(3): p. 273-6.
61. Olanow, C.W., M.F. Brin, and J.A. Obeso, *The role of deep brain stimulation as a surgical treatment for Parkinson's disease*. Neurology, 2000. **55**(12 Suppl 6): p. S60-6.
62. daily, S. *Gene Therapy For Parkinson's Disease Is Safe And Some Patients Benefit, According To Study*. 2007
63. Garcia-Segura, L.M., I. Azcoitia, and L.L. DonCarlos, *Neuroprotection by estradiol*. Prog Neurobiol, 2001. **63**(1): p. 29-60.
64. Mhyre, A.J. and D.M. Dorsa, *Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia*. Neuroscience, 2006. **138**(3): p. 851-8.
65. Purdie, D.W., *Consequences of long-term hormone replacement therapy*. Br Med Bull, 2000. **56**(3): p. 809-23.
66. Gelinas, S., et al., *Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress*. Neurotox Res, 2004. **6**(2): p. 141-8.
67. Heinonen, S., et al., *In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(7): p. 3178-86.
68. Miyake, Y., et al., *Antioxidative catechol lignans converted from sesamin and sesaminol triglucoside by culturing with Aspergillus*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(1): p. 22-7.
69. Namiki, M., *Nutraceutical functions of sesame: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007. **47**(7): p. 651-73.
70. Lampe, J.W., C. Atkinson, and M.A. Hullar, *Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans*. J AOAC Int, 2006. **89**(4): p. 1174-81.

71. Hemalatha, S., M. Raghunath, and Ghafoorunissa, *Dietary sesame oils inhibits iron-induced oxidative stress in rats [corrected]*. Br J Nutr, 2004. **92**(4): p. 581-7.
72. Isabelle Berta-Vanrullen, C.S., Carole Thomann, *Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations*. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2005.
73. D'Archivio, M., et al., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 348-61.
74. Umeda-Sawada, R., M. Ogawa, and O. Igarashi, *The metabolism and distribution of sesame lignans (sesamin and episesamin) in rats*. Lipids, 1999. **34**(6): p. 633-7.
75. Liu, Z., N.M. Saarinen, and L.U. Thompson, *Sesamin is one of the major precursors of mammalian lignans in sesame seed (Sesamum indicum) as observed in vitro and in rats*. J Nutr, 2006. **136**(4): p. 906-12.
76. Yamashita, K., Kawagoe, Y., Nohara, M., Namiki, M., Osawa, T., and Kawakashi, S., *Effects of sasame in the senescence-accelerated mouse*. Eiyo Shokuryou Gakkaishi, 1990. **43**: p. 2440-2446.
77. Yokota, T., et al., *Sesamin, a lignan of sesame, down-regulates cyclin D1 protein expression in human tumor cells*. Cancer Sci, 2007. **98**(9): p. 1447-53.
78. Ide, T., et al., *Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1534**(1): p. 1-13.
79. Hirose, N., et al., *Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin*. J Lipid Res, 1991. **32**(4): p. 629-38.
80. Nobuo Tsuruoka, A.K., Ichiro Matsumoto, Keiko Abe and Yoshinobu Kiso, *Modulating Effect of sesamin, a functional lignan in sesame seeds, on the transcription levels of lipid and alcohol-metabolizing enzymes in rat liver: A DNA microarray study*. Biosci. Biotechno. Biochem, 2005. **69**(1): p. 179-188.
81. Ogawa, T., et al., *Lack of influence of low blood cholesterol levels on pancreatic carcinogenesis after initiation with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters*. Carcinogenesis, 1994. **15**(8): p. 1663-6.
82. Sugano, M., Inoue, T., Koba, K., Yoshida, K., Hirose, N., Shinmen, Y., Akimoto, K., and amachi, T., *Influence of sesame lignans on various lipid parameters in rats*. Agric. biol. chem., 1990. **54**: p. 2669-2673.

83. Hirata, F., et al., *Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans*. Atherosclerosis, 1996. **122**(1): p. 135-36.
84. Ah-Reum Han, H.J.K., Minkyu Shin, Moochang Hong, Yang Seok Kim, and Hyunsu Bae, *Constituents of asarum sieboldii with inhibitory activity on lipopolysaccharide (LPS)-Induced NO Production in BV-2 Microglial Cells*. Chemistry and Biodiversity, 2008. **5**: p. 346-351.
85. Yang, Z., Suwa, Y., Hirai, K., Toyoda, y., Asami, S., and tanaka, T., *Effects of sesamin on ethanol-induced muscle relaxation*. Nippon Eiyo-Shokuryo Gakkaishi, 1995. **48**: p. 103-108.
86. Akimoto, K., et al., *Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents*. Ann Nutr Metab, 1993. **37**(4): p. 218-24.
87. Matsumura, Y., et al., *Antihypertensive effect of sesamin. I. Protection against deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiovascular hypertrophy*. Biol Pharm Bull, 1995. **18**(7): p. 1016-9.
88. Sankar, D., et al., *Modulation of blood pressure, lipid profiles and redox status in hypertensive patients taking different edible oils*. Clin Chim Acta, 2005. **355**(1-2): p. 97-104.
89. Fukuda, Y., and Namiki, M., *Recent studies on sesame seed and oil*. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1988. **35**: p. 552-562.
90. Suja, K.P., A. Jayalekshmy, and C. Arumughan, *Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (sesamum indicum L.) in DPPH(*) system*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 912-5.
91. Nakai, M., et al., *Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(6): p. 1666-70.
92. Ghafoorunissa, S. Hemalatha, and M.V. Rao, *Sesame lignans enhance antioxidant activity of vitamin E in lipid peroxidation systems*. Mol Cell Biochem, 2004. **262**(1-2): p. 195-202.
93. Gagne, B., et al., *Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress*. Endocrine, 2003. **21**(1): p. 89-95.
94. Roche, *Cytotoxicity detection kit (LDH)*. 1999: p. Cat. No. 1 644 793.
95. Kooy, N.W., et al., *Peroxyxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(2): p. 149-56.

96. Gollapudi, L. and M.M. Oblinger, *Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ERalpha-transfected PC12 cells from apoptosis*. J Neurosci Res, 1999. **56**(5): p. 471-81.
97. Shimada, S., et al., *Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA*. Science, 1991. **254**(5031): p. 576-8.
98. Schmidt, S., H. Michna, and P. Diel, *Combinatory effects of phytoestrogens and 17beta-estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **94**(5): p. 445-9.
99. Rousseau, J., et al., *Modulation of prolactin expression by xenoestrogens*. Gen Comp Endocrinol, 2002. **126**(2): p. 175-82.
100. Putz, T., et al., *Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphate*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(11): p. 1374-83.
101. Co.KG, L.D.N.G.e., *Dopamine EIA*. Vol. BA 10-0300.
102. chemical, C. *Superoxide dismutase assay kit*. Catalog No. 706 002
103. Kalra, J., et al., *Oxygen free radicals induced release of lysosomal enzymes in vitro*. Mol Cell Biochem, 1988. **84**(2): p. 233-8.
104. Marchetti, B. and M.P. Abbracchio, *To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?* Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(10): p. 517-25.
105. Alam, Z.I., et al., *Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra*. J Neurochem, 1997. **69**(3): p. 1196-203.
106. Maier, C.M. and P.H. Chan, *Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders*. Neuroscientist, 2002. **8**(4): p. 323-34.
107. Langston, J.W. and I. Irwin, *MPTP: current concepts and controversies*. Clin Neuropharmacol, 1986. **9**(6): p. 485-507.
108. Heikkila, R.E., et al., *Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse*. Mol Chem Neuropathol, 1989. **10**(3): p. 171-83.
109. Kopin, I.J. and S.P. Markey, *MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease*. Annu Rev Neurosci, 1988. **11**: p. 81-96.

110. Segura Aguilar, J. and R.M. Kostrzewa, *Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration*. Neurotox Res, 2004. **6**(7-8): p. 615-30.
111. Koppenol, W.H., et al., *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(6): p. 834-42.
112. Obata, T., *Nitric oxide and MPP⁺-induced hydroxyl radical generation*. J Neural Transm, 2006. **113**(9): p. 1131-44.
113. Shahidi, F. and P.K. Wanasundara, *Phenolic antioxidants*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1992. **32**(1): p. 67-103.
114. Noguchi, T., et al., *Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Hypertens Res, 2001. **24**(6): p. 735-42.
115. Kiso, Y., *Antioxidative roles of sesamin, a functional lignan in sesame seed, and its effect on lipid- and alcohol-metabolism in the liver: a DNA microarray study*. Biofactors, 2004. **21**(1-4): p. 191-6.
116. Fujikawa, T., et al., *Effect of sesamin in Acanthopanax senticosus HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(1): p. 169-72.
117. Jeng, K.C., et al., *Sesamin inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production by suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB*. Immunol Lett, 2005. **97**(1): p. 101-6.
118. Miwa, H., et al., *Oxidative stress and microglial activation in substantia nigra following striatal MPP⁺*. Neuroreport, 2004. **15**(6): p. 1039-44.
119. Henze, C., et al., *Proliferation of microglial cells induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in mesencephalic cultures results from an astrocyte-dependent mechanism: role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. J Neurochem, 2005. **95**(4): p. 1069-77.
120. Martin, A. and M. Clynes, *Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests*. In Vitro Cell Dev Biol, 1991. **27A**(3 Pt 1): p. 183-4.
121. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. J Immunol Methods, 1988. **115**(1): p. 61-9.
122. Frantseva, M.V., P.L. Carlen, and J.L. Perez Velazquez, *Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(10): p. 1216-27.

123. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7)
124. Henderson, L.M. and J.B. Chappell, *Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?* Eur J Biochem, 1993. **217**(3): p. 973-80.
125. Thomas, B., K.S. Saravanan, and K.P. Mohanakumar, *In vitro and in vivo evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole*. Neurochem Int, 2008. **52**(6): p. 990-1001.
126. Cheng, Y.H., S.T. Ding, and M.H. Chang, *Effect of fumonisins on macrophage immune functions and gene expression of cytokines in broilers*. Arch Anim Nutr, 2006. **60**(4): p. 267-76.
127. Galati, G., et al., *Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics*. Toxicology, 2002. **177**(1): p. 91-104.
128. Anekonda, T.S., *Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease?* Brain Res Rev, 2006. **52**(2): p. 316-26.
129. Hartman, R.E., et al., *Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2006. **24**(3): p. 506-15.
130. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
131. Chiasson, K., et al., *Dopamine D2 agonists, bromocriptine and quinpirole, increase MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells*. Neurotox Res, 2006. **10**(1): p. 31-42.
132. Kadota, T., et al., *Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(9): p. 989-96.
133. Nilsen, J., G. Mor, and F. Naftolin, *Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells*. Menopause, 1998. **5**(4): p. 211-6.
134. Lee, V., J.Q. Trojanowski, and W.W. Schlaepfer, *Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor*. Brain Res, 1982. **238**(1): p. 169-80.
135. Vitaglione, P., et al., *Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(5): p. 495-504.

136. Ross, J.A. and C.M. Kasum, *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 19-34.
137. McCarty, M.F., *Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders*. Med Hypotheses, 2006. **67**(2): p. 251-69.
138. Drechsel, D.A. and M. Patel, *Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(11): p. 1873-86.
139. Nunomura, A., et al., *Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2007. **6**(6): p. 411-23.
140. Currie, L.J., et al., *Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(6): p. 886-8.
141. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. Jama, 2002. **288**(3): p. 321-33.
142. Esposito, E., et al., *A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(5): p. 719-35.
143. Di Matteo, V. and E. Esposito, *Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2003. **2**(2): p. 95-107.
144. Mytilineou, *Mechanism of MPTP neurotoxicity. Mechanisms of Degeneration and Protection of the Dopaminergic System*
ed. E. Segura-Aguilar J. 2001, Johnson City, TN: FP Graham Publ. pp 131-148.
145. Blanchet, J., et al., *Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(5): p. 1243-50.
146. Mehler-Wex, C., P. Riederer, and M. Gerlach, *Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder*. Neurotox Res, 2006. **10**(3-4): p. 167-79.
147. Salahpour, A., et al., *Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4405-10.

148. Itano, Y., Y. Kitamura, and Y. Nomura, *1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced cell death in PC12 cells: inhibitory effects of several drugs*. *Neurochem Int*, 1994. **25**(5): p. 419-24.
149. Fall, C.P. and J.P. Bennett, Jr., *Characterization and time course of MPP+ -induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells*. *J Neurosci Res*, 1999. **55**(5): p. 620-8.
150. Sirato-Yasumoto, S., et al., *Effect of sesame seeds rich in sesamin and sesamolin on fatty acid oxidation in rat liver*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(5): p. 2647-51.
151. Kushiro, M., Y. Takahashi, and T. Ide, *Species differences in the physiological activity of dietary lignan (sesamin and episesamin) in affecting hepatic fatty acid metabolism*. *Br J Nutr*, 2004. **91**(3): p. 377-86.
152. An, L.J., et al., *Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP+-induced neurotoxicity in PC12 cells*. *Food Chem Toxicol*, 2006. **44**(3): p. 436-43.
153. Hou, R.C., et al., *Protective effects of sesamin and sesamolin on murine BV-2 microglia cell line under hypoxia*. *Neurosci Lett*, 2004. **367**(1): p. 10-3.
154. Jung, T.W., et al., *Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(1): p. 221-7.
155. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *Protection against MPP+ neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants*. *Cell Biol Int*, 2004. **28**(5): p. 373-80.
156. Chen, J., et al., *Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway*. *Apoptosis*, 2006. **11**(6): p. 943-53.
157. Bureau, G., F. Longpre, and M.G. Martinoli, *Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation*. *J Neurosci Res*, 2008. **86**(2): p. 403-10.
158. Bi, X.L., et al., *Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia*. *Int Immunopharmacol*, 2005. **5**(1): p. 185-93.
159. Li, R., et al., *(-)-Epigallocatechin gallate inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation and protects against inflammation-mediated dopaminergic neuronal injury*. *J Neurosci Res*, 2004. **78**(5): p. 723-31.

160. Wang, M.J., et al., *Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(11): p. 2103-12.
161. Hou, R.C., et al., *Protective effects of sesamin and sesamolin on hypoxic neuronal and PC12 cells*. J Neurosci Res, 2003. **74**(1): p. 123-33.
162. Hou, R.C., et al., *Effect of sesame antioxidants on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells*. Neuroreport, 2003. **14**(14): p. 1815-9.
163. Gao, J.P., et al., *Triptolide protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: implication for immunosuppressive therapy in Parkinson's disease*. Neurosci Bull, 2008. **24**(3): p. 133-42.
164. Gomez-Santos, C., et al., *Dopamine induces TNFalpha and TNF-R1 expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Neuroreport, 2007. **18**(16): p. 1725-8.
165. Hunot, S., et al., *FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells*. J Neurosci, 1999. **19**(9): p. 3440-7.
166. Mogi, M., et al., *Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 1996. **211**(1): p. 13-6.
167. Thomas, B. and K.P. Mohanakumar, *Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum*. J Pineal Res, 2004. **36**(1): p. 25-32.
168. Thiffault, C., et al., *Effect of MPTP and L-deprenyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in mouse brain*. J Neurochem, 1995. **65**(6): p. 2725-33.
169. Vicky Lahaie-Collins, J.B., 1 Marilyn Plouffe, 1 Julie Carangel and Maria-Grazia Martinoli^{1,2}, *Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP⁺-induced oxidative stress*. Oxidative Medicine & Cellular Longevity 2008. **1:1**(July/August): p. 1-9.
170. Jeffrey N Joyce, C.W., Han Ryoo, Sabine Borwege and Diane Hagner, *Low dose pramipexole is neuroprotective in MPTP mouse model of Parkinson's disease, and downregulates the dopamine transporter via D3 receptor*. BMC Biology, 2004. **2**: p. 22.
171. Haavik, J. and K. Toska, *Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease*. Mol Neurobiol, 1998. **16**(3): p. 285-309.

172. Obata, T., *Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation*. J Neural Transm, 2002. **109**(9): p. 1159-80.
173. Xu, Z., et al., *Selective alterations of transcription factors in MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells*. Neurotoxicology, 2005. **26**(4): p. 729-37.
174. Bannon, M.J., *The dopamine transporter: role in neurotoxicity and human disease*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(3): p. 355-60.
175. Nagai, Y., et al., *Progressive changes of pre- and post-synaptic dopaminergic biomarkers in conscious MPTP-treated cynomolgus monkeys measured by positron emission tomography*. Synapse, 2007. **61**(10): p. 809-19.
176. Amara, G.M.D.a.S.G., *Regulated trafficking of the human dopamine transporter*. The journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(50): p. 35794-35801.